



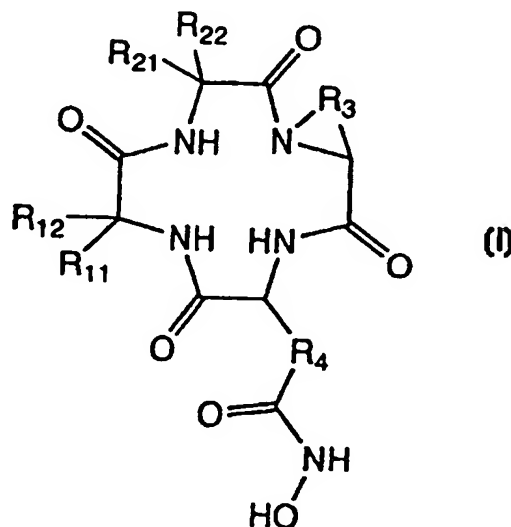
(51) 国際特許分類 C07K 5/12, A61K 38/12	A1	(11) 国際公開番号 WO99/11659  (43) 国際公開日 1999年3月11日(11.03.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/03893  (22) 国際出願日 1998年9月1日(01.09.98)  (30) 優先権データ 特願平9/237481 1997年9月2日(02.09.97) 特願平10/63270 1998年3月13日(13.03.98)  (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ジャパンエナジー (JAPAN ENERGY CORPORATION)[JP/JP] 〒105-8407 東京都港区虎ノ門二丁目10番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 西野憲和(NISHINO, Norikazu)[JP/JP] 〒808-0104 福岡県北九州市若松区島田1-6-6 Fukuoka, (JP) 吉田 稔(YOSHIDA, Minoru)[JP/JP] 〒334-0059 埼玉県川口市安行655番地21 Saitama, (JP) 堀之内末治(HORINOUCHI, Sucharu)[JP/JP] 〒135-0044 東京都江東区越中島1-3-16-403 Tokyo, (JP)	小松靖彦(KOMATSU, Yasuhiko)[JP/JP] 三本 勤(MIMOTO, Tsutomu)[JP/JP] 〒335-8502 埼玉県戸田市新曽南三丁目17番35号 株式会社 ジャパンエナジー内 Saitama, (JP) (74) 代理人 弁理士 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3F Tokyo, (JP)  (81) 指定国 AU, CA, JP, KR, NO, NZ, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  添付公開書類 国際調査報告書	

(54) Title: NOVEL CYCLIC TETRAPEPTIDE DERIVATIVES AND MEDICINAL USE THEREOF

(54) 発明の名称 新規な環状テトラペプチド誘導体とその医薬用途

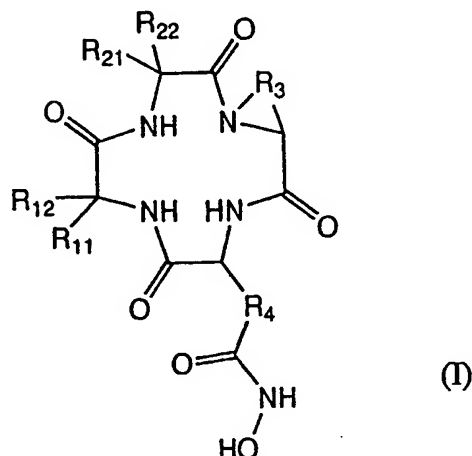
(57) Abstract

Cyclic tetrapeptide derivatives represented by general formula (I) or pharmaceutically acceptable salts thereof, cyclic tetrapeptide compounds analogous thereto, and histone deacetylase inhibitors, MHC class-I molecule expression promoters and medicinal compositions containing these cyclic tetrapeptide derivatives as the active ingredient: wherein  $R_{11}$ ,  $R_{12}$ ,  $R_{21}$  and  $R_{22}$  represent each hydrogen or a monovalent group selected from linear or branched  $C_{14}$  alkyl, benzyl, 4-methoxybenzyl, 3-indolylmethyl, (N-methoxy-3-indolyl)methyl, (N-formyl-3-indolyl)methyl, etc.;  $R_3$  represents a divalent group selected from divalent linear  $C_{3-4}$  hydrocarbyl optionally having a branched chain added thereto or optionally substituted by a heteroatom; and  $R_4$  represents a divalent group derived from divalent linear  $C_{4-6}$  hydrocarbyl optionally having a branched chain added thereto.



## (57)要約

一般式 (I) :



(式中、

R<sub>11</sub>、R<sub>12</sub>、R<sub>21</sub>、R<sub>22</sub>は、それぞれ水素、炭素数6以下の直鎖又は分岐のアルキル基、ベンジル基、4-メトキシベンジル基、3-インドリルメチル基、(N-メトキシ-3-インドリル)メチル基、(N-フォルミル-3-インドリル)メチル基等から選択される一価の基を表し、

R<sub>3</sub>は、炭素数3又は4の直鎖の鎖式炭化水素基、または、前記の直鎖鎖式炭化水素基の鎖上への分岐鎖の付加、更にはヘテロ原子置換された二価の基から選択される二価の基を表し、

R<sub>4</sub>は、鎖長が4~6の二価の鎖式炭化水素基、又は、当該鎖上に分岐鎖の付加等により誘導される二価の基を表す)で示される環状テトラペプチド誘導体又はその薬学的に許容される塩、あるいは、その類縁の環状テトラペプチド誘導体化合物、並びに、該環状テトラペプチド誘導体を有効成分として含有するヒストンデアセチラーゼ酵素阻害剤、MHC class-I 分子発現促進剤および医薬組成物。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		

## 明 細 書

## 新規な環状テトラペプチド誘導体とその医薬用途

## 技術分野

本発明は、新規な環状テトラペプチド誘導体又はその薬学的に許容される塩と該化合物のヒストンデアセチラーゼ阻害剤並びに MHC class-I 分子発現促進剤としての応用、並びに、前記するヒストンデアセチラーゼ阻害作用あるいは MHC class-I 分子発現促進作用を利した、抗癌剤等の医薬用途を有する当該環状テトラペプチド誘導体又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする医薬組成物に関する。

## 背景技術

自己の組織細胞は、本来外部から侵襲した異物、病原体等と区別し、免疫細胞による誤った傷害を防ぐため、抗原提示分子として MHC class-I 分子をその細胞表面に発現している。免疫系は、MHC class-I 分子を識別することで、自己の組織細胞であるとして、その攻撃対象から除いている。他方、本来自己細胞ではあるが、癌化した細胞、あるいは癌化ウイルスに感染した細胞では、正常な自己細胞と異なり、癌化に伴う蛋白質、あるいは癌化ウイルス由来蛋白質が生産され、これら非自己蛋白質に由来する抗原が MHC class-I 分子により提示される。免疫細胞、特に、細胞傷害性 T 細胞は、この非自己蛋白質に由来する抗原を認識することで、癌細胞、あるいは癌化ウイルス感染細胞を排除することができる。

しかしながら、ある種の癌細胞あるいは癌化ウイルス感染細胞においては、この MHC class-I 分子の発現が低下しており、前記の免疫系による排除機構を回避し、癌化組織の伸長・拡大、癌化ウイルス感染の長期持続化、拡大が引き起こされることが報告されている。これら癌細胞あるいは癌化ウイルス感染細胞の造腫瘍性抑制を目的とした研究において、低下した MHC class-I 分子の発現を回復させることで治療効果が達成されることを示唆する結果が報告されており、例えば、アデノウイルス 12 型で形質転換した癌細胞や自然発症メラノーマにおいて、低下

している MHC class-I 分子の発現を MHC class-I 遺伝子の導入により高めてやることで、これら癌細胞の造腫瘍性が消失することを田中らが報告している (Tanaka, K., Isselbacher, K.J., Khoury, G., and Jay, G. Science 228, 26-30, 1985; Tanaka, K., Gorelik, E., Watanabe, M., Hozumi, N., and Jay, G. Mol. Cell. Biol. 8, 1857-1861, 1988 等を参照)。

ところで、MHC class-I 分子の発現は、その自己組織細胞の細胞増殖後、分化過程の一環として起こるものであり、この過程での内因性蛋白質の翻訳を促進することで、MHC class-I 分子の発現も促進されることが期待される。内因性蛋白質の翻訳を調整している機構は幾つかあるが、遺伝子発現に重要な役割を果たしていると考えられるものの一つに、核遺伝子クロマチン中にその構造蛋白質として含まれるヒストン蛋白のアセチル化がある。具体的には、クロマチンは、4種類のコアヒストン8量体に遺伝子DNAが巻き付き、言謂ヌクレオソーム構造と称される基本単位をなし、更にこれが高次構造を形成しているが、そのコアヒストンのN末端付近は塩基性アミノ酸に富んだテール状をとり、前記ヌクレオソーム上のDNAをさらに被う構造をとる。このテール域付近のリジン残基は、可逆的なアセチル化の代謝回転を被っており、ヌクレオソーム自体の構造制御、あるいは、遺伝子DNAに作用する他の蛋白質(転写因子群、サイレンサー蛋白質群、RNAポリメラーゼなど)との結合制御を介する転写制御に密接に係わっているとされている。

ヒストンのアセチル化に依存する遺伝子発現制御の査証として、ヒストンの高アセチル化は、その領域に存在する遺伝子からの発現誘導を促進し、一方脱アセチル化は、ヘテロクロマチンと称される転写不活性な領域を形成することが報告されている。即ち、クロマチンの構造蛋白質であるヒストンとそのアセチル化は、染色体遺伝子の全域に及ぶものであるにも係わらず、その機能は特定の遺伝子の発現に大きな影響を及ぼし、いわば核内情報伝達にかかわる厳密な制御に関与することが示唆されている。ヒストンのアセチル化を行う酵素は、ヒストンアセチルトランスフェラーゼであり、逆に脱アセチル化を行う酵素は、ヒストンデアセチラーゼであり、この両酵素はヒストンアセチル化レベルの動的な代謝回転を調

整している。

ヒストンデアセチラーゼの作用が亢進すると、細胞の適正な分化や形態正常化が阻害されるが、このヒストンデアセチラーゼの酵素活性を阻害すると、ヒストンからの脱アセチル化が抑制される結果、ヒストン高アセチル化が引き起こされ、分化や形態正常化に必要な遺伝子発現が誘導される。この現象は、ヒストンデアセチラーゼに対する酵素阻害物質である、図1に示すトリコスタチン A (トリコスタチン A) や図2に示すトラボキシシン (trapoxin) 類縁体を用いた研究によりある程度確認されている。加えて、これら阻害物質を更に高い濃度で細胞に作用させると、細胞周期の阻害が引き起こされ、結果として増殖阻害が起こる。なお、トリコスタチン A は、低濃度で非拮抗的な酵素阻害作用を示し、また、可逆的な阻害剤であるが、トラボキシシン類縁体は、競争的な阻害作用を示すが、不可逆的な阻害剤である。また、ヒト細胞由来のヒストンデアセチラーゼの酵素活性サブユニットは、トラボキシシンと類似する環状テトラペプチド化合物の K-trap を用いたアフィニティーカラムで精製されたとの報告がなされており、トラボキシシン等に見られる環状テトラペプチド構造が当該酵素活性サブユニットと選択的な分子間結合を形成することの有力な査証が与えられている。

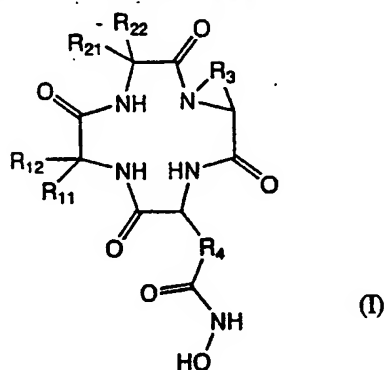
上述するとおり、ヒストンデアセチラーゼに対する酵素阻害物質は、細胞分化又は形状正常化を起こす薬剤となるので、分化過程の一環としておこる MHC class-I 分子発現に対しても促進作用を示す可能性があるものの、これまでのところ、それを確認させる報告はされていない。従って、自己組織細胞での MHC class-I 分子発現に対する促進作用を示すヒストンデアセチラーゼ酵素阻害物質の探索・提案が待望されている。また、上の述べた通り、ヒストンデアセチラーゼ酵素阻害物質は高濃度において、細胞周期の阻害を引き起こし、結果として増殖阻害が起こる作用を示すので、MHC class-I 分子発現促進に伴う、造腫瘍性の抑制、並びに、免疫系による癌細胞の排除、加えて、細胞増殖の阻害作用も寄与した複合的な抗癌作用を示す、新規な MHC class-I 分子発現促進に由来する抗癌剤の提案も待たれている。

本発明は、上記の課題を解決するものであり、本発明の目的は、自己組織細胞でのMHC class-I分子発現に対する促進作用を示すヒストンデアセチラーゼ酵素阻害物質の提供、ならびに、該ヒストンデアセチラーゼ酵素阻害物質を有効成分とする医薬組成物の提供にある。

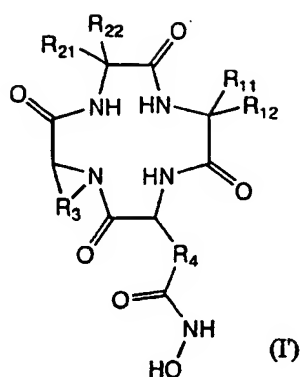
#### 発明の開示

本発明者らは、前記の課題を解決すべく、鋭意研究を進め、ヒストンデアセチラーゼ酵素阻害活性を有するトリコスタチンAやその類縁化合物トリコスタチンCを動物細胞に作用させた際、MHC class-I分子発現を促進することを見出し、更に、前記のトリコスタチン類以外に、ヒストンデアセチラーゼ酵素阻害活性を有する酪酸やトラボキシニンAもやはりMHC class-I分子発現促進活性を示すことを見出した。これらの知見に基づき、環状テトラペプチド誘導体種々を創製するとともに、これら環状テトラペプチド誘導体がヒストンデアセチラーゼの酵素活性を可逆的に阻害し、且つMHC class-I分子発現促進活性を示すことを見出し、本発明を完成するに至った。

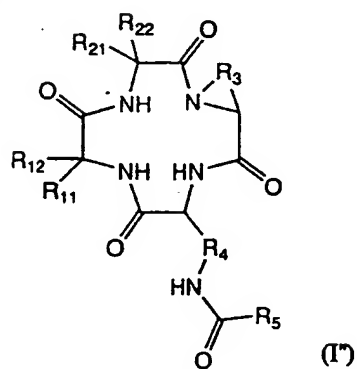
即ち、本発明は、一般式(I)：



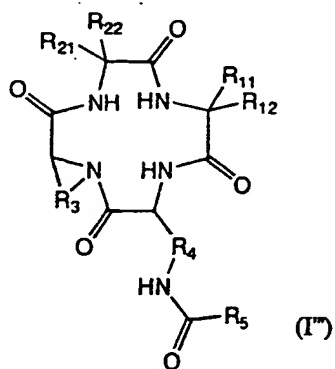
一般式(I')：



一般式 (I'') :



又は一般式 (I''') :



(式中、

R<sub>11</sub>、R<sub>12</sub>、R<sub>21</sub>、R<sub>22</sub>は、それぞれ水素、炭素数1～6の直鎖アルキル基、炭素数3～6の分岐のアルキル基、炭素数1～5の直鎖ω-アミノアルキル基、炭素数3～5の分岐のアミノアルキル基、前記の直鎖又は分岐アミノアルキル基上のアミノ基上に炭素数3以下のアシル基又はハロゲン置換アシル基が置換してなるN-ア

シルーアミノアルキル基、ベンジル基、4-メトキシベンジル基、3-インドリルメチル基、(N-メトキシ-3-インドリル)メチル基、炭素数3以下のアシル基を環状窒素上に置換基として有する(N-アシル-3-インドリル)メチル基、環数4以下のアリール基が置換したメチル基から選択される一価の基を表し、 $R_3$ は、鎖上に分岐鎖を有してもよい鎖長炭素数3又は4の直鎖アルキレン基、鎖上に分岐鎖を有してもよい鎖長炭素数3又は4の直鎖アルケニレン基、鎖上に分岐鎖を有してもよい鎖長炭素数4の直鎖アルカジエニレン基、並びに、前記の直鎖アルキレン基、直鎖アルケニレン基及びアルカジエニレン基上に付加される分岐鎖が縮合環構造を形成したもの、または、これら鎖式炭化水素基を構成する炭素原子のうち、遊離原子価が存在する炭素原子以外の炭素原子の一つが酸素、イオウ又は窒素の何れかのヘテロ原子に置き換わってなる二価の基から選択される二価の基を表し、

$R_4$ は、当該鎖上に分岐鎖を有してもよい鎖長炭素数4～6の二価の鎖式炭化水素基、およびこれら鎖式炭化水素基を構成する炭素原子のうち、遊離原子価が存在する炭素原子以外の炭素原子の一つ以上が酸素、イオウ又は窒素の何れかのヘテロ原子に置き換わってなる二価の基を表し、

$R_5$ は、鎖長が4～6の二価の鎖式炭化水素基、更に、当該鎖上に分岐鎖を有してもよく、または、これら鎖式炭化水素基を構成する炭素原子のうち、遊離原子価が存在する炭素原子以外の炭素原子の一つ以上が酸素、イオウ又は窒素の何れかのヘテロ原子に置き換わってなる二価の基を表し、

一般式(I'')あるいは(I''')中の $R_6$ は、メチル基またはハロゲン置換メチル基を表す)の何れかで示される環状テトラペプチド誘導体又はその薬学的に許容される塩であり、更には、前記の環状テトラペプチド誘導体又はその薬学的に許容される塩の何れかを有効成分とするヒストンデアセチラーゼ阻害剤、MHC class-I分子発現促進剤、並びに、前記の環状テトラペプチド誘導体又はその薬学的に許容される塩の何れかを有効成分として含有する抗癌剤などの医薬用途組成物である。

#### 図面の簡単な説明

図1は、トリコスタチンA、トラボキシンの分子構造並びにヒストン脱アセチ



ル化阻害の作用を示す図。

図2は、トラボキシン類縁体の分子構造を示す図。

図3は、実施例1～3及び参考例1の化合物のMHC class-I分子発現促進作用とその添加濃度依存性を示す図。

図4は、実施例4、5の化合物及びトリコスタチンAのMHC class-I分子発現促進作用とその添加濃度依存性を示す図。

図5は、ニコチン酸とその誘導体のMHC class-I分子発現促進作用とその添加濃度依存性を示す図。

図6は、実施例1の化合物並びにトリコスタチンAの添加によるB16/BL6細胞内におけるヒストン脱アセチル化を阻害する効果を示す図。

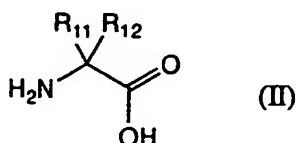
図7は、実施例21の化合物；HDA-31のマウス尾静脈内投与後の血中濃度推移を示す図。

発明を実施するための最良の形態

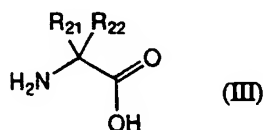
本発明の環状テトラペプチド誘導体、その製造方法に関して、以下により詳しく説明する。加えて、該環状テトラペプチド誘導体の示す薬理活性につき概説する。

本発明の環状テトラペプチド誘導体は、上述する通り、一般式(I)～(I')の化学式で示される4種の互いに相關した構造の何れかにより示される。先ず、この4種の分子構造が、以下に述べる通り、構造上、互いに密な相關関係を有し、その意味において、高い構造上の類似性を有する化合物群であることを説明する。

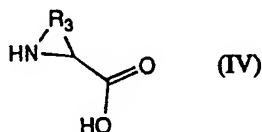
本発明の一般式(I)で示される環状テトラペプチド誘導体は、一旦それを構成する4アミノ酸を連結して、対応する鎖状テトラペプチド誘導体を調製し、次いで、この鎖状テトラペプチド誘導体を環化して得られるものである。即ち、次の一般式(II)：



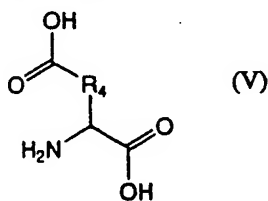
(式中、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ は、それぞれ一般式 (I) の  $R_{11}$ 、 $R_{12}$  と同じ基を表す) で示される  $\alpha$ -アミノ酸、一般式 (III) :



(式中、 $R_{21}$ 、 $R_{22}$ は、それぞれ一般式 (I) の  $R_{21}$ 、 $R_{22}$  と同じ基を表す) で示される  $\alpha$ -アミノ酸、一般式 (IV) :



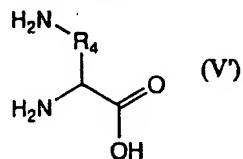
(式中、 $R_3$ は、一般式 (I) の  $R_3$  と同じ基を表す) で示される環状の  $\alpha$ -アミノ酸、一般式 (V) :



(式中、 $R_4$ は、一般式 (I) の  $R_4$  と同じ基を表す) で示される  $\alpha$ -アミノ酸、これら一般式 (II) ~ (V) で示される4種の  $\alpha$ -アミノ酸をペプチド結合により環状テトラペプチド骨格を形成したのち、前記一般式 (V) の側鎖カルボキシル基をヒドロキサム酸に誘導したものである。

本発明の一般式 (I') で示される環状テトラペプチド誘導体は、前記の一般式 (I) で示される環状テトラペプチド誘導体に対して、ペプチド鎖の形成を逆方向に行ったものに相当する。即ち、一般式 (I) で示される環状テトラペプチド誘導体は、同じ一般式 (II) ~ (V) で示される4種の  $\alpha$ -アミノ酸をN末からC末に向かい (II)  $\rightarrow$  (III)  $\rightarrow$  (IV)  $\rightarrow$  (V) の順で連結したアミノ酸配列を有するが、一般式 (I') で示される環状テトラペプチド誘導体は、一般式 (II) ~ (V) で示される4種の  $\alpha$ -アミノ酸をN末からC末に向かい (V)  $\rightarrow$  (IV)  $\rightarrow$  (III)  $\rightarrow$  (II) の順で連結したアミノ酸配列を有する。

本発明の一般式 (I'') で示される環状テトラペプチド誘導体は、一般式 (I) で示される環状テトラペプチド誘導体に対して、一般式 (V) で示される側鎖にカルボキシル基を有する  $\alpha$ -アミノ酸に換え、次の一般式 (V') :



(式中、 $\text{R}_4$  は、一般式 (I'') の  $\text{R}_4$  と同じ基を表す) で示される側鎖にアミノ基を有する  $\alpha$ -アミノ酸を用い、一般式 (II) ~ (IV) と一般式 (V') で示される 4 種の  $\alpha$ -アミノ酸を同じ並びに、即ち、N 末から C 末に向かい (II)  $\rightarrow$  (III)  $\rightarrow$  (IV)  $\rightarrow$  (V') の順でペプチド結合により環状テトラペプチド骨格を形成したのち、前記一般式 (V') の側鎖アミノ基をアシル基で修飾したものである。

また、本発明の一般式 (I''') で示される環状テトラペプチド誘導体は、前記の一般式 (I'') で示される環状テトラペプチド誘導体に対して、ペプチド鎖の形成を逆方向に行ったものに相当する。即ち、一般式 (I'') で示される環状テトラペプチド誘導体は、一般式 (II) ~ (V) で示される 4 種の  $\alpha$ -アミノ酸を N 末から C 末に向かい (II)  $\rightarrow$  (III)  $\rightarrow$  (IV)  $\rightarrow$  (V) の順で連結したアミノ酸配列を有するが、一般式 (I') で示される環状テトラペプチド誘導体は、同じ一般式 (II) ~ (V) で示される 4 種の  $\alpha$ -アミノ酸を N 末から C 末に向かい (V)  $\rightarrow$  (IV)  $\rightarrow$  (III)  $\rightarrow$  (II) の順で連結したアミノ酸配列を有する。

本発明の一般式 (I) で示される環状ペプチドにおいて、それを構成する  $\alpha$ -アミノ酸の立体配置は、L-体、D-体の何れをも取り得るが、構造的な安定性の観点から、少なくとも一つのアミノ残基は、他のアミノ酸残基と異なる立体配置をとることが好ましい。具体的には、これら 4 種の  $\alpha$ -アミノ酸の立体配置を、少なくとも 1 つを D-体にとり、残りを L-体とすると良い。例えば、4 種の  $\alpha$ -アミノ酸のうち、D-体の一つを選択する際には、一般式 (V) の  $\alpha$ -アミノ酸に隣接する一般式 (II) 又は一般式 (IV) の  $\alpha$ -アミノ酸の何れかを D-体とすればよく、D-体を二つ選択する際には、一般式 (V) の  $\alpha$ -アミノ酸に隣接する一般式 (II) 及び一般式 (IV) の  $\alpha$ -アミノ酸をともに D-体とすればよい。

なお、一般式 (II) 並びに一般式 (III) の  $\alpha$ -アミノ酸とともにグリシン、即ち、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$  並びに  $R_{21}$ 、 $R_{22}$  をともに水素を選択する際には、残る二つのアミノ酸とともに同じ立体配置に選択してもよい。この特異な選択においては、連続する二つのグリシンの存在により、この部位は柔軟性が高いゆえ、環状ペプチド全体として構造的安定性を保つことが可能となる。

より好ましくは、前記4種のアミノ酸のうち、環状アミノ酸である一般式 (IV) で示されるものを、D-体を選択し、残る3種をL-体を選択する、あるいは、一般式 (IV) で示されるものを、L-体を選択し、残る3種をD-体を選択する。乃至は、前記4種のアミノ酸のうち、環状アミノ酸である一般式 (IV) の  $\alpha$ -アミノ酸並びに一般式 (II) の  $\alpha$ -アミノ酸を、ともにD-体を選択し、残る2種をL-体を選択するとより好ましい。特に、一般式 (II) の  $\alpha$ -アミノ酸残基の側鎖が嵩高い際には、環状アミノ酸である一般式 (IV) の  $\alpha$ -アミノ酸並びに一般式 (II) の  $\alpha$ -アミノ酸を、ともにD-体を選択し、残る2種をL-体を選択すると一層好ましい。即ち、この環状ペプチドにおいて、本来の基質であるN-アセチル化リジンの側鎖に替わり、ヒストンデアセチラーゼの酵素活性点に対して近接する部位は、一般式 (V) のアミノ酸の側鎖カルボキシル基から誘導されるヒドロキサム酸であるので、この一般式 (V) のアミノ酸は、天然のリジンと同じく、L-体を選択するのが一層好ましい。従って、環状アミノ酸である一般式 (IV) で示されるものを、D-体を選択し、残る3種をL-体を選択する、あるいは、環状アミノ酸である一般式 (IV) の  $\alpha$ -アミノ酸並びに一般式 (II) の  $\alpha$ -アミノ酸を、ともにD-体を選択し、残る2種をL-体を選択することが一層好ましい態様となる。

より好ましくは、前記4種のアミノ酸のうち、環状アミノ酸である一般式 (IV) で示されるものを、D-体を選択し、残る3種をL-体を選択する、あるいは、一般式 (IV) で示されるものを、L-体を選択し、残る3種をD-体を選択する。なお、この環状ペプチドにおいて、本来の基質であるN-アセチル化リジンの側鎖に替わり、ヒストンデアセチラーゼの酵素活性点に対して近接する部位は、一般式 (V) のアミノ酸の側鎖カルボキシル基から誘導されるヒドロキサム

酸であるので、この一般式 (V) のアミノ酸は、天然のリジンと同じく、L-体を選択するのが一層好ましい。従って、環状アミノ酸である一般式 (IV) で示されるものを、D-体を選択し、残る3種をL-体を選択することが一層好ましい態様となる。

次いで、一般式 (V) のアミノ酸側鎖から誘導された側鎖ヒドロキサム酸構造； $-R_4-CO-NH-OH$  に関して述べると、上述するとおり、この部位は、本来の基質である N-アセチル化リジンの側鎖； $-(CH_2)_4-NH-CO-CH_3$  に替わる部位であり、二価の基  $R_4$  の鎖長は、少なくとも4以上がよく、上限の6以下とするのがよい。即ち、 $R_4$  の鎖長が4未満とすると、ヒストンデアセチラーゼの酵素活性点に対して適切に近接することができず、他方、7以上になると、不要に長くなってしまい、何れの場合にも、ヒストンデアセチラーゼの酵素活性阻害能が著しく損なわれる。

この二価の基  $R_4$  は、N-アセチル化リジンの側鎖と同じく分岐鎖のないものでよく、既知阻害物質トリコスタチン A における対応する鎖状部分と同様に、鎖上に分岐鎖が存在してもよい。なお、分岐鎖は、その鎖長は、4を超えるない範囲から選択するとよく、好ましくは、炭素数3以下、特に、炭素数1のメチル基 ( $CH_3-$ ) 又はメチリデン基 ( $CH_2=$ ) がより好ましい。 $R_4$  の主鎖は、飽和のアルキレン基、或いは、不飽和のアルケニレン基、アルカジエニレン基の何れでもよく、分岐鎖のメチリデン基 ( $CH_2=$ ) を有する場合には、前記の主鎖より不飽和炭素-炭素結合が増えることになる。但し、主鎖中に不飽和炭素-炭素結合を有する場合、主鎖の方向に関して、トランス型となるものがよい。

なお、具体的に一般式 (V) のアミノ酸の一例をあげると、 $R_4$  に炭素数4のテトラメチレン基を選択するものは2-アミノヘプタン二酸 ( $\alpha$ -アミノピメリン酸；H-Api-OH) であり、 $R_4$  に炭素数5のペンタメチレン基を選択するものは2-アミノオクタン二酸 ( $\alpha$ -アミノスベリン酸；H-Asu-OH) であり、 $R_4$  に炭素数6のヘキサメチレン基を選択するものは2-アミノノナン二酸 ( $\alpha$ -アミノアゼライン酸；H-Aaz-OH) である。

環状テトラペプチドの残る部分は、前記の一般式 (V) のアミノ酸に由来する側鎖ヒドロキサム酸構造； $-R_4-CO-NH-OH$  をヒストンデアセチラーゼの酵素活性点に向け、保持する役割を持ち、この働きは、既知の不可逆的な阻害剤であるトラボキシン類縁体の環状ペプチド部の機能と実質的に同じものである。即ち、この環状テトラペプチドの残る部分によりて、ヒストンデアセチラーゼの酵素活性点近傍に分子間結合し、前記の一般式 (V) のアミノ酸に由来する側鎖ヒドロキサム酸構造を酵素活性点上に固定する役割を持つ。

従って、残る3種の $\alpha$ -アミノ酸は、その側鎖を利用してヒストンデアセチラーゼ蛋白質表面に結合できる限り、如何なるものでもよいが、一般式 (IV) の環状アミノ酸は、前記の一般式 (V) のアミノ酸に由来する側鎖ヒドロキサム酸構造の向く方向を固定する際、主に機能する。一般式 (IV) の環状アミノ酸の環構造は、図2に示すトラボキシンBにおける天然のD-プロリンと同じ5員環、あるいは、図2に示すトラボキシンAにおける天然のD-ピペリジン-2-カルボン酸と同じ6員環の何れかが好ましい。従って、この環を構成する二価の基 $R_3$ は、プロリンにおけるトリメチレン基、ピペリジン-2-カルボン酸におけるテトラメチレン基、あるいは、これら鎖長3又は4の直鎖炭化水素基に対応し、炭素-炭素二重結合を有する不飽和な直鎖炭化水素基が好ましい。なお、前記の鎖長3又は4の直鎖炭化水素基鎖上に分岐鎖が付加されるものでもよく、分岐鎖に代えて、環構造が縮合した構造を形成するもの、あるいは、これら二価の炭化水素基において、アミノ窒素原子並びにカルボン酸の $\alpha$ 位の炭素原子と結合を形成している、当該二価の基における遊離原子価の存在する炭素原子以外の炭素原子を、酸素、イオウ、又は窒素の何れかのヘテロ原子で置き換えたものでもよい。前記する分岐鎖に代えて、環構造が縮合した構造を形成するものは、一般式 (IV) の環状アミノ酸において、 $R_3$ 自体環の一部として存在する。例えば、1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸は、ピペリジン-2-カルボン酸にベンゼン環が縮合した構造を形成したものに相当し、この例のように、環状アミノ酸の環構造が二つの環が縮合した構造となっているものを意味する。なかでも、 $R_3$ には、トリメチレン基、テトラメチレン基、あるいは、これら鎖長3又は4の直鎖炭化

水素基に対応し、炭素-炭素二重結合を有する不飽和な直鎖炭化水素基等がより好ましい。

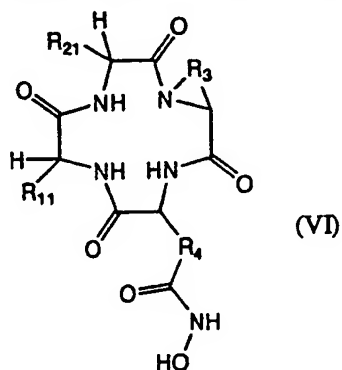
なお、一般式 (IV) の環状アミノ酸に換えて、当該環状アミノ酸の環構造を形成する炭素鎖が分断された類似の構造を持った N-アルキル化 $\alpha$ -アミノ酸、例えば、N-メチルグリシン (サルコシン) 等を用いる変形も本発明に包含される。なお、この一般式 (IV) の環状アミノ酸に換えて、類似の構造を持った N-アルキル化 $\alpha$ -アミノ酸を利用する際には、当該 N-アルキル化 $\alpha$ -アミノ酸は、D 体の環状アミノ酸の立体配置と等価な立体配置を採るものが好ましい。従って、N-アルキル化に利用されるアルキル基としては、メチル基またはエチル基が好ましく、特に、メチル基がより好ましい。

残る二つの $\alpha$ -アミノ酸は、天然に見出される $\alpha$ -アミノ酸と同じ程度の嵩を有する側鎖を持つものが一般には、好ましい。即ち、図2に示すトラボキシン類縁体におけるチロシンのp-ヒドロキシベンジル基、フェニルアラニンのベンジル基、あるいはトリプトファンの3-インドリルメチル基程度の嵩を上限とするものである。また、これらトラボキシン類縁体中の対応部分と同じく、塩基性アミノ酸あるいは酸性アミノ酸以外のアミノ酸、即ち、疎水性アミノ酸ならびに親水性アミノ酸のうち中性アミノ酸が好ましい。更には、天然の疎水性アミノ酸ならびに親水性アミノ酸のうち中性アミノ酸と構造的な類似性を有する非天然のアミノ酸でもよい。従って、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$  並びに  $R_{21}$ 、 $R_{22}$  における好ましい選択肢としては、水素、炭素数1~6の直鎖アルキル基、炭素数3~6の分岐のアルキル基、ベンジル基、4-メトキシベンジル基、3-インドリルメチル基、(N-メトキシ-3-インドリル)メチル基、(N-フォルミル-3-インドリル)メチル基、更には、ベンジル基と類似する、環数4以下のアリール基が置換したメチル基等を挙げることができる。前記する環数4以下のアリール基が置換したメチル基とは、縮合環構造を構成する環数が4以下のアリール基、例えば、1-ナフチル基、1-フェナントリル基などにより置換されたメチル基を意味し、ベンジル基に更にベンゼン環が縮合したものに相当する。

加えて、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 並びに $R_{21}$ 、 $R_{22}$ で表される $\alpha$ -アミノ酸側鎖においては、図1に示すトリコスタチンAに見られるN、N-ジメチルアミノフェニル基の如く、それに含まれるアミノ基窒素原子上に二置換がなされているものを用いることもでき、あるいは、ベンジル基中のフェニル基に換えてピリミジル基の如く、複素芳香環基中に窒素原子を含むものに置き換えたものを用いることができる。更には、側鎖のカルボキシル基をエステル、アミドに変換したものも用いることができる。

また、図2に示すクラミドシンにおいて見出される、2-メチルアラニン(2-アミノ-2-メチルプロパン酸; H-Aib-OH)の如く、通常の天然の $\alpha$ -アミノ酸の $\alpha$ 位上に更に嵩の小さな側鎖が存在してもよい。なお、2-メチルアラニンなどのように、ともに立体的な干渉を及ぼさない嵩の小さな側鎖である場合を除き、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ の何れかは水素原子を選択するとよい。同じ理由から、 $R_{21}$ 、 $R_{22}$ の何れかは水素原子を選択するとよい。特に、上記の一般式(II)並びに一般式(III)で表される $\alpha$ -アミノ酸として、天然の疎水性アミノ酸並びにチロシンなど、蛋白質との結合において、疎水性相互作用に利するものを選択するとより一層好ましい。なお、チロシンあるいはトリプトファンなど、ヒドロキシル基やイミノ基が存在する場合、ヒドロキシル基をO-アルキル化する、イミノ基をN-アルコキシ化する、あるいは、N-アシル化する等の修飾を施し、当該原子団を保護するとよい。

従って、一般式(I)で示される環状テトラペプチド誘導体において、一層好ましいものの一例を挙げると、次の一般式(VI)：



(式中、 $R_{11}$ は一般式(I)の $R_{11}$ と同義の基を表し、 $R_{21}$ は一般式(I)の $R_{21}$ と



同義の基を表し、 $R_3$ は一般式(I)の $R_3$ と同義の基を表し、 $R_4$ は一般式(I)の $R_4$ と同義の基を表す。)で示すことができ、 $R_{11}$ 、 $R_{21}$ には、天然の疎水性アミノ酸並びにチロシンなど、蛋白質との結合において、疎水性相互作用に利するものを選択するとより一層好ましい。具体的には、一般式(VI)において、フェニルアラニンのベンジル基、チロシンのp-ヒドロキシベンジル基又はそのO-メチル化したp-メトキシベンジル基、アラニンのメチル基、イソロイシンの1-メチルプロピル基、バリンのイソプロピル基、ロイシンのイソブチル基、グリシンの水素、あるいは、エチル基、プロピル基などを $R_{11}$ 、 $R_{21}$ に選択すると一層好ましいものとなる。また、 $R_{11}$ に選択する基が、前記するベンジル基、p-メトキシベンジル基など芳香環を含む基である際には、 $R_{21}$ に選択する基は、鎖状炭化水素基を選択すると好ましい。この組み合わせは、当該環状ペプチドの合成を行う際にも利する。

本発明の一般式(I')の環状テトラペプチド誘導体は、一般式(I)の環状テトラペプチド誘導体における環を形成するアミノ酸配列を反転させたものであり、一般式(I)の環状テトラペプチド誘導体において、好ましい一般式(II)~(V)のアミノ酸の選択は、一般式(I')の環状テトラペプチド誘導体においても、同様に好ましいものである。また、一般式(II)~(V)のアミノ酸の立体配置に関しても、一般式(IV)の環状 $\alpha$ -アミノ酸並びに一般式(II)の $\alpha$ -アミノ酸をD-体を選択し、残りの2種の $\alpha$ -アミノ酸をL-体とする、あるいは、その鏡像体となるように選択するとより好ましい。

また、本発明の一般式(I'')の環状テトラペプチド誘導体は、一般式(I)の環状テトラペプチド誘導体における一般式(V)に示す $\alpha$ -アミノ酸の側鎖カルボキシル基から誘導されたヒドロキサム酸構造を、基質アセチル化ヒストンにおけるアセチル化リシン残基の側鎖のN-アセチルアミノ基構造に類する構造に置き換えたものに相当する。従って、一般式(II)~(IV)のアミノ酸の選択は、一般式(I)の環状テトラペプチド誘導体において、好ましい一般式(II)~(IV)のアミノ酸の選択は、一般式(I'')の環状テトラペプチド誘導体においても、同様に好ましいものである。また、一般式(V)のアミノ酸に関しても、その側鎖を構

成する二価の基  $R_4$  に関しては、一般式 (I) の環状テトラペプチド誘導体において、一般式 (V) のアミノ酸に由来する二価の基  $R_4$  として好ましいものは、同様に好ましいものとなる。特に、一般式 (V) のアミノ酸と異なる点は、一般式 (V) のアミノ酸においては、アセチル化リシン残基の側鎖に対応する、二価の基  $R_4$  の鎖長を 4 に選択すると一層好ましいことである。また、一般式 (II) ~ (IV)、及び (V) のアミノ酸の立体配置は、上述した一般式 (I) の環状テトラペプチド誘導体において好ましい選択は、同じく好ましい。結果として、一般式 (I) の環状テトラペプチド誘導体において好ましい一例である上記一般式 (VI) のヒドロキサム酸構造を N-アシル化アミノ基構造に置き換えた一連の化合物は、一般式 (I') の環状テトラペプチド誘導体においても、好ましい一例となる。

また、本発明の一般式 (I'') の環状テトラペプチド誘導体は、一般式 (I) の環状テトラペプチド誘導体における一般式 (V) に示す  $\alpha$ -アミノ酸の側鎖カルボキシル基から誘導されたヒドロキサム酸構造を、基質アセチル化ヒストンにおけるアセチル化リシン残基の側鎖の N-アセチルアミノ基構造に類する構造に置き換えたものに相当する。従って、一般式 (II) ~ (IV) のアミノ酸の選択は、一般式 (I) の環状テトラペプチド誘導体において、好ましい一般式 (II) ~ (IV) のアミノ酸の選択は、一般式 (I'') の環状テトラペプチド誘導体においても、同様に好ましいものである。また、一般式 (V) のアミノ酸に関しても、その側鎖を構成する二価の基  $R_4$  に関しては、一般式 (I) の環状テトラペプチド誘導体において、一般式 (V) のアミノ酸に由来する二価の基  $R_4$  として好ましいものは、同様に好ましいものとなる。結果として、一般式 (I) の環状テトラペプチド誘導体において好ましい一例である上記一般式 (VI) のヒドロキサム酸構造を N-アシル化アミノ基構造に置き換えた一連の化合物は、一般式 (I'') の環状テトラペプチド誘導体においても、好ましい一例となる。

本発明の一般式 (I''') の環状テトラペプチド誘導体は、一般式 (I') の環状テトラペプチド誘導体における一般式 (V) に示す  $\alpha$ -アミノ酸の側鎖カルボキシル基から誘導されたヒドロキサム酸構造を、基質アセチル化ヒストンにおけるアセチル化リシン残基の側鎖の N-アセチルアミノ基構造に類する構造に置き換え

たものに相当する。あるいは、一般式 (I'') の環状テトラペプチド誘導体における環を形成するアミノ酸配列を反転させたものにも相当する。従って、一般式 (II) ~ (IV) のアミノ酸の選択は、一般式 (I) の環状テトラペプチド誘導体において、好ましい一般式 (II) ~ (IV) のアミノ酸の選択は、一般式 (I''') の環状テトラペプチド誘導体においても、同様に好ましいものである。また、一般式 (V) のアミノ酸に関しても、その側鎖を構成する二価の基  $R_4$  に関しては、一般式 (I) の環状テトラペプチド誘導体において、一般式 (V) のアミノ酸に由来する二価の基  $R_4$  として好ましいものは、同様に好ましいものとなる。特に、一般式 (V) のアミノ酸と異なる点は、一般式 (V') のアミノ酸においては、アセチル化リシン残基の側鎖に対応する、二価の基  $R_4$  の鎖長を 4 に選択すると一層好ましいことである。また、一般式 (II) ~ (IV)、及び (V) のアミノ酸の立体配置は、上述した一般式 (I') の環状テトラペプチド誘導体において好ましい選択は、同じく好ましい。

本発明の一般式 (I''') の環状テトラペプチド誘導体は、一般式 (I') の環状テトラペプチド誘導体における一般式 (V) に示す  $\alpha$ -アミノ酸の側鎖カルボキシル基から誘導されたヒドロキサム酸構造を、基質アセチル化ヒストンにおけるアセチル化リシン残基の側鎖の N-アセチルアミノ基構造に類する構造に置き換えたものに相当する。あるいは、一般式 (I'') の環状テトラペプチド誘導体における環を形成するアミノ酸配列を反転させたものにも相当する。従って、一般式 (II) ~ (IV) のアミノ酸の選択は、一般式 (I) の環状テトラペプチド誘導体において、好ましい一般式 (II) ~ (IV) のアミノ酸の選択は、一般式 (I''') の環状テトラペプチド誘導体においても、同様に好ましいものである。また、一般式 (V) のアミノ酸に関しても、その側鎖を構成する二価の基  $R_4$  に関しては、一般式 (I) の環状テトラペプチド誘導体において、一般式 (V) のアミノ酸に由来する二価の基  $R_4$  として好ましいものは、同様に好ましいものとなる。

本発明の環状テトラペプチド誘導体は、その環を形成するアミノ酸配列が同じ又はその逆順序である、一般式 (I) ~ (IV) の 4 種の何れかであるが、アミノ酸配列が同じである場合、一般に、一般式 (I) の化合物は、一般式 (I') の化

合物より好ましく、一般式 (I'') の化合物は、一般式 (I''') の化合物より好ましい。一般式 (I) の化合物と一般式 (I'') の化合物の比較においては、一般式 (V) のアミノ酸残基の側鎖を構成する  $R_4$  と一般式 (V') のアミノ酸残基の側鎖を構成する  $R_4$  が同じ場合、一般に、一般式 (I) の化合物がより好ましい。

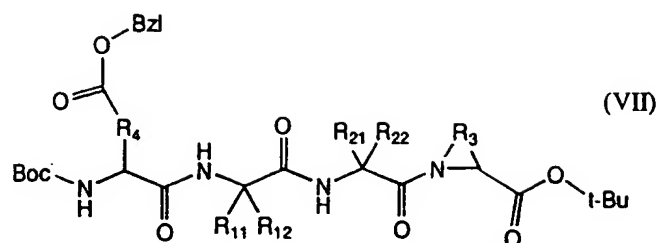
本発明の一般式 (I) の環状テトラペプチド誘導体は、上述するとおり、一般式 (II) ~ (V) に示す 4 種の  $\alpha$ -アミノ酸を出発原料として、ペプチド鎖の形成・環化の工程により製造することができる。その工程の一例に関して、以下に概説する。

#### (製造方法)

本発明の環状テトラペプチド誘導体は、一旦一般式 (II) ~ (V) に示す 4 種の  $\alpha$ -アミノ酸がペプチド結合した鎖状のテトラペプチド中間体を調製し、しかる後に環状テトラペプチドとし、最終的に一般式 (V) に示す  $\alpha$ -アミノ酸の側鎖カルボキシル基をヒドロキサム酸構造に誘導することで製造することができる。以下のこの製造工程を概説する。なお、鎖状のテトラペプチド中間体は、目的とする環状テトラペプチド誘導体の何れのペプチド結合で開裂した構造を用いることができるが、以下の説明では、一般式 (IV) で表される環状  $\alpha$ -アミノ酸を C 末に、一般式 (V) で表される  $\alpha$ -アミノ酸を N 末とする鎖状のテトラペプチド中間体を経る合成経路を例にとり説明する。

#### (工程 1) 鎖状のジ、トリ、及びテトラペプチドの合成

まず、汎用のペプチド合成法に従い、一般式 (III) 及び一般式 (IV) のアミノ酸を結合し、更に一般式 (II) のアミノ酸を結合し、最後に、側鎖カルボキシル基をベンジルエステル化して保護した一般式 (V) のアミノ酸、例えば、L-Aaz(OBzl)、L-Asu(OBzl)、L-Api(OBzl) 等を結合して、下記一般式 (VII) :



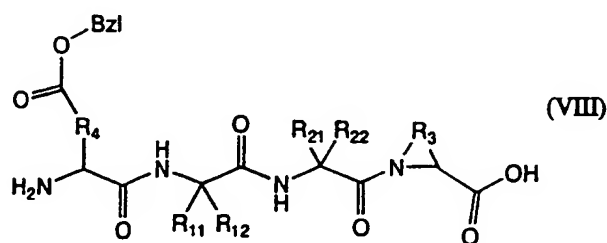
(式中、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{21}$ 、 $R_{22}$ 、 $R_3$ 並びに $R_4$ は、それぞれ一般式(I)の $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{21}$ 、 $R_{22}$ 、 $R_3$ 並びに $R_4$ と同じ基を表す)で示される鎖状テトラペプチドを形成する。

なお、この過程において、原料アミノ酸のアミノ保護基には Boc-基または Z-基、またカルボキシル基保護のためには tert-ブチルエステルを用い、DCC/HOBt 法により縮合した。また、Z-基は酢酸中 Pd-C 触媒によって接触還元的に除去し、酢酸を留去した後、フリーアミンとして重曹水を用いて酢酸エチル中に抽出した。抽出液から回収した生成物の油状物を真空乾燥後の次の縮合に用いた。

一般式 (VII) で示される全保護鎖状テトラペプチドはシリカゲルカラムを用いるフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。

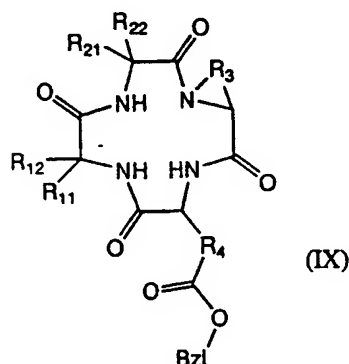
#### (工程 2) 高々度希釈法による環状ペプチドの合成

トリフルオロ酢酸を用いて、一般式 (VII) で示される全保護鎖状テトラペプチドの Boc-基及び tert-ブチルエステルの除去(脱保護)を行った。下記の一般式 (VIII) :



(式中、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{21}$ 、 $R_{22}$ 、 $R_3$ 並びに $R_4$ は、それぞれ一般式(I)の $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{21}$ 、 $R_{22}$ 、 $R_3$ 並びに $R_4$ と同じ基を表す。)で示される生成物は、反応液からトリフルオロ酢酸を留去後、エーテル及び石油エーテルで固化し、真空乾燥した。

一般式 (VIII) で示されるペプチド使用予定量の 1/10 量を DMF に溶解し 0.1mM の濃度になるように設定した。DMF 溶液に氷冷下、第三級アミン、例えば、ジイソプロピルエチルアミン及び HATU (0-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1, 1, 3, 3-tetramethyluronium hexafluorophosphate) を加え、室温で 30 分間攪拌した。引き続き、前記の DMF 溶液に、一般式 (VIII) で示されるペプチド使用予定量の 1/10 量とジイソプロピルエチルアミン及び HATU を追加し、室温で 30 分間攪拌した。前記の操作を計 10 回繰り返して環化反応を行った。反応終了後、下記一般式 (IX) :



(式中、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{21}$ 、 $R_{22}$ 、 $R_3$ 並びに $R_4$ は、それぞれ一般式 (I) の $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{21}$ 、 $R_{22}$ 、 $R_3$ 並びに $R_4$ と同じ基を表す。) で示される反応生成物(環状ペプチド)を酢酸エチル中に抽出し、シリカゲルカラムを用いるフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。

### (工程 3) 側鎖ヒドロキサム酸構造の導入

一般式 (IX) で示される環状ペプチドの側鎖ベンジルエステルは、メタノール中 Pd-C 触媒によって接触還元的に除去し、メタノールを留去した後、真空乾燥し、カルボン酸として油状物を得た。

前記の脱保護により得られた側鎖カルボン酸の環状ペプチド化合物及び HOBt を DMF に溶解し、氷冷下ヒドロキシルアミン塩酸塩、トリエチルアミン、次いで BOP 試薬を添加し 1 時間攪拌した。反応終了後、DMF を留去し、水でデカンテーションを行った後、凍結乾燥により、最終生成物の白色粉末を得た。この白色粉末を少量のメタノールに溶解し、HPLC でセミ分取用カラムを用いて精製し、凍結乾燥により一般式 (I) で示される目的物を得た。

本発明の一般式(I')で示される環状テトラペプチド誘導体は、上述する工程1に準じて、鎖状のテトラペプチドの合成を行い、次いで、工程2の条件を利用して環状テトラペプチドとする。原料の一般式(V)で示される $\alpha$ -アミノ酸に由来する側鎖ベンジルエステル等の形状で保護されているカルボキシル基を工程3に準じて、側鎖ヒドロキサム酸構造に変換することで調製することができる。

一方、本発明の一般式(I'')で示される環状テトラペプチド誘導体は、一般式(V)で示される $\alpha$ -アミノ酸に換え、一般式(V)で示される $\alpha$ -アミノ酸を用いて、上述の工程1に準じて、鎖状のテトラペプチドの合成を行い、次いで、工程2の条件を利用して環状テトラペプチドとする。この際、該一般式(V)で示される $\alpha$ -アミノ酸の側鎖アミノ基は、ベンジルオキシカルボニル基(Z基)等の汎用される保護基を用いて保護し、一連のペプチド結合の形成と環化反応を行う。次いで、得られた環状テトラペプチド中、当該一般式(V)で示される $\alpha$ -アミノ酸の側鎖アミノ基上の保護基を脱保護し、一旦塩酸塩とする。しかる後、目的のアシル基をこの側鎖アミノ基上に置換・導入する。例えば、目的のアシル基の導入は、対応する酸無水物を用い、汎用のN-アシル化反応により行うことができる。

本発明の一般式(I''')で示される環状テトラペプチド誘導体も、一般式(V)で示される $\alpha$ -アミノ酸に換え、一般式(V)で示される $\alpha$ -アミノ酸を用いて、上述した一般式(I')で示される環状テトラペプチド誘導体の合成にけると同様に、環状テトラペプチド構造を形成する。しかる後に、この環状テトラペプチド構造中、当該一般式(V)で示される $\alpha$ -アミノ酸の側鎖アミノ基上の保護基を脱保護し、一旦塩酸塩とする。しかる後、目的のアシル基をこの側鎖アミノ基上に置換・導入する。このN-アシル化反応は、一般式(I'')で示される環状テトラペプチド誘導体における条件に準じて行うことができる。

上記の合成法に加え、一般式(I)又は一般式(I')で示される化合物に関しては、下に述べる実施例14、実施例18、実施例23において、具体例により示す固相合成法を利用した方法により合成を行うことができる。また、一般式

(I'') 又は一般式 (I''') で示される化合物についても、下に述べる実施例 14、実施例 18 において、具体例により示す固相合成法を利用した方法に準じて、ペプチド鎖の延長とその環化反応を行うことができる。

本発明の環状テトラペプチド誘導体の薬学的に許容される塩とは、例えば、塩基性を示す窒素原子を含む誘導体では、塩酸塩などの薬学的に許容される無機酸との塩、酢酸塩などの薬学的に許容される有機酸との塩を意味する。

本発明の MHC class-I 分子発現促進剤は、上で説明した側鎖末端にヒドロキサム酸構造 (ヒドロキシアミノカルボニル構造) を持つ環状テトラペプチド誘導体、あるいは、側鎖末端に N-アシル化アミノ基構造を持つ環状テトラペプチド誘導体を有効成分とするものであり、下記する試験例に示すとおり、優れた発現促進活性を有する。その MHC class-I 分子発現促進作用は、ヒストンデアセチラーゼ酵素阻害活性に付随するものであるが、ヒドロキサム酸構造を持つトリコスタン A と同じく、この阻害は可逆的なものであると考えられる。また、高い濃度投与で顕著となるヒストンデアセチラーゼ酵素阻害自体に起因する細胞増殖阻害、細胞周期の阻害作用のみならず、促進された MHC class-I 分子発現に起因する、細胞傷害性 T 細胞の関与する癌細胞や癌化ウイルス感染細胞の排除作用の相補的な効果で、高い治療効果を発揮する利点を持つ。加えて、不可逆的な阻害剤であるトラボキシン類縁体と比較するとき、正常組織細胞に対する副作用等、生体に対する好ましさからざる影響の残留が少なく、治療効果と対比するとき、相対的な副作用が大幅に低減された薬剤としての応用が期待される。

本発明の医薬組成物は、前記の MHC class-I 分子発現促進作用を利用して治療効果を達成するものであるが、有効成分となる環状テトラペプチド誘導体の用量は、その治療目的、症状の程度、投与対象者の性別、年齢、体重等に応じて適宜決定されるものである。投与対象者が成人男子である場合、1 日当たりの用量を  $0.1 \sim 50 \text{ mg/kg}$  の範囲、好ましくは、 $0.5 \sim 10 \text{ mg/kg}$  の範囲内に選ぶのが一般的であり、数回に分けて投与すると好ましい。この医薬組成物は、有効成分となる環状テトラペプチド誘導体にこの種のペプチド様化合物製剤に汎

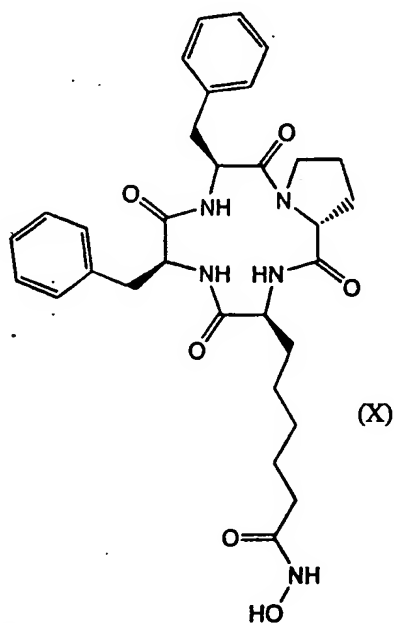


用される添加剤を加えて、投与経路に適する剤形とすることができる。細胞透過性に富むものであるので、多種の投与経路が利用することが可能であるが、ペプチドホルモンなどの投与に多様される投与形態、投与経路を取るのが好ましい。

本発明の環状テトラペプチド誘導体とその製造方法、並びに、該環状テトラペプチド誘導体の有する優れた生理活性、即ち、MHC class-I 分子発現促進作用及びヒストンデアセチラーゼ酵素阻害活性に優れることを具体例により説明する。

(実施例 1) HDA-5 ; cyclo(-Asu(NHOH)-Phe-Phe-D-Pro-)

下記式 (X) :



で示される環状テトラペプチド HDA-5 ; cyclo(-Asu(NHOH)-Phe-Phe-D-Pro-)の合成方法を工程を追って述べる。

cyclo (-Asu(NHOH)-Phe-Phe-D-Pro-)の合成

#### 工程 1-1 Z-Phe-D-Pro-OtBu

Z-Phe-OH(874 mg, 2.92 mmol), H-Pro-OtBu(500mg, 2.92 mmol), HOBt · H<sub>2</sub>O(490 mg, 3.20 mmol)のDMF(15ml)溶液に、氷冷下にて DCC(660 mg, 3.20 mmol)を加え、

そのまま1時間、さらに室温で終夜撹拌した。反応液を濾過、濃縮後、酢酸エチルに再溶解し、10%クエン酸、4% NaHCO<sub>3</sub> および飽和食塩水で順次洗浄した。無水MgSO<sub>4</sub>上で乾燥後、濃縮、残渣をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー(CHCl<sub>3</sub>)で精製し、標記ジペプチド化合物 1.40g(quant)を油状物質として得た。

R<sub>f</sub> = 0.72 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 9/1)

#### 工程 1-2 Z-Phe-Phe-D-Pro-OtBu

工程 1-1 で得られたジペプチド化合物 Z-Phe-D-Pro-OtBu (700 mg, 1.45 mmol) を酢酸(5 ml)に溶解し、5% Pd/C (70 mg)存在下、水素雰囲気下で終夜(約14時間)撹拌した。反応混合物を濾過、濃縮後、油状残渣を酢酸エチルに溶解し、4% NaHCO<sub>3</sub> で洗浄した。無水炭酸ナトリウム上で乾燥後、濃縮して H-Phe-D-Pro-OtBu(425mg, 92%)を得た。これを、DMF(5ml)に再溶解し、Z-Phe-OH(434 mg, 1.45 mmol)、HOBt.H<sub>2</sub>O(245 mg, 1.60 mmol)、さらに氷冷下にて DCC(330 mg, 1.60 mmol)を加え、そのまま終夜撹拌した。反応液を濾過、濃縮後、酢酸エチルに再溶解し、10%クエン酸、4% NaHCO<sub>3</sub> および飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO<sub>4</sub>上で乾燥後、濃縮、残渣をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー(CHCl<sub>3</sub>)で精製し、標記トリペプチド化合物 720 mg(90%)を泡状物質として得た。

R<sub>f</sub> = 0.52 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 9/1)

#### 工程 1-3 Boc-Asu(OBzl)-Phe-Phe-D-Pro-OtBu

工程 1-2 で得られたトリペプチド化合物 Z-Phe-Phe-D-Pro-OtBu (422 mg, 0.704 mmol)を酢酸(5 ml)に溶解し、5%Pd/C (40 mg)存在下、水素雰囲気下で終夜(約14時間)撹拌した。反応混合物を濾過、濃縮後、油状残渣を酢酸エチルに溶解し、4% NaHCO<sub>3</sub> で洗浄した。無水炭酸ナトリウム上で乾燥後、濃縮して H-Phe-Phe-D-Pro-OtBu(302mg, 92%)を得た。

これを、DMF(5ml)に再溶解し、Boc-Asu(OBzl)-OH(320 mg, 0.844 mmol)、HOBt.H<sub>2</sub>O(142 mg, 0.844 mmol)、さらに氷冷下にて DCC(192 mg, 0.928 mmol)を加え、そのまま終夜撹拌した。反応液を濾過、濃縮後、酢酸エチルに再溶解し、10%クエン酸、4% NaHCO<sub>3</sub> および飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO<sub>4</sub>上で乾燥後、濃縮、残渣をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー(CHCl<sub>3</sub>)で精製し、標記鎖状テト

ラベプチド化合物 426 mg(80%)を泡状物質として得た。

Rf = 0.59 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 9/1)

HPLC: Rt = 23.5 min (column : Wako Pak C4, 4.6×150 mm, 37 - 100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min)

#### 工程 1-4 H-Asu(OBzl)-Phe-Phe-D-Pro-OH. TFA

工程 1-3 で得られた化合物 Boc-Asu(OBzl)-Phe-Phe-D-Pro-OtBu (426 mg, 0.52 mmol)に TFA(2 ml)を加え、氷冷下 2 時間攪拌した。反応液を濃縮し、残渣にエーテル/石油エーテル(1/5)を加え沈殿させ、標記化合物(366mg, 90%)を白色粉末として得た。

Rf = 0.47 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AcOH= 90/10/2)

HPLC: Rt = 10.32 min (条件は工程 1-3 と同じ)

FAB-MS: m/z = 671 (M+1)

#### 工程 1-5 cyclo(-Asu(OBzl)-Phe-Phe-D-Pro-)

工程 1-4 で得られた化合物 H-Asu(OBzl)-Phe-Phe-D-Pro-OH. TFA (31 mg, 0.040 mmol)の DMF(400 ml)溶液に、HATU(23 mg, 0.060 mmol)、10%DIEA/DMF(280 μl, 0.16 mmol)を加え室温で 30 分間攪拌した。さらに、化合物 H-Asu(OBzl)-Phe-Phe-D-Pro-OH. TFA (31 mg, 0.040 mmol)、HATU (23 mg, 0.060 mmol)、10% DIEA/DMF(280 μl, 0.16 mmol)を 30 分毎に 9 回加えた。反応液を濃縮後、残渣を酢酸エチルに再溶解し、10%クエン酸、4% NaHCO<sub>3</sub> および飽和食塩水で順次洗浄、無水 MgSO<sub>4</sub> 上で乾燥、濃縮した。得られた残渣を、シリカゲルクロマトグラフィー (2.5%メタノール/CHCl<sub>3</sub>) にて精製し、標記環状テトラペプチド化合物 (220 mg, 84%) を油状物質として得た。

HPLC: Rt = 14.20 min (条件は工程 1-3 と同じ)

#### 工程 1-6 cyclo(-Asu(OH)-Phe-Phe-D-Pro-)

工程 1-5 で得られた化合物 cyclo(-Asu(OBzl)-Phe-Phe-D-Pro-) (94 mg, 0.144 mmol)を MeOH(3 ml)に溶解し、5% Pd/C(10 mg)存在下、水素雰囲気下で 4 時間攪拌した。反応混合物を濾過、濃縮して、標記化合物(74 mg, 91%)を油状物質とし

て得た。

HPLC: Rt = 17.03 min (column : Wako Pak C18, 4.6×150 mm, 10 - 100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min)

工程 1-7 cyclo(-Asu(NHOH)-Phe-Phe-D-Pro-)

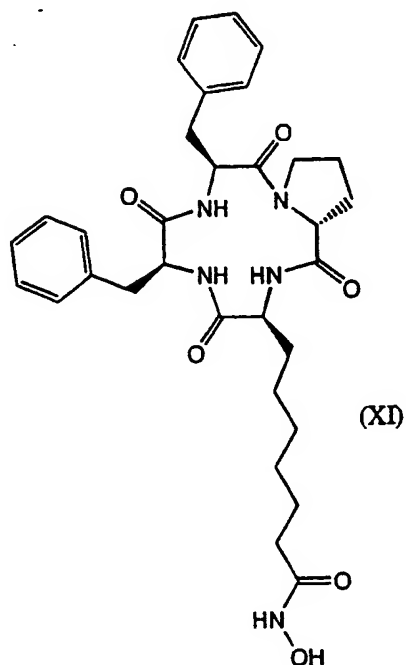
工程 1-6 で得られた化合物 cyclo(-Asu(OH)-Phe-Phe-D-Pro-) (74 mg, 0.132 mmol)、HOBt · H<sub>2</sub>O (30 mg, 0.198 mmol) の DMF (3 ml) 溶液に、塩酸ヒドロキシルアミン (19 mg, 0.264 mmol) の DMF 溶液に TEA (40 μl, 0.264 mmol) を加え中和処理した後濾過した濾液、BOP (90 mg, 0.178 mmol) を氷冷下にて加え、3 時間攪拌した。反応液を濃縮後、これを、MeOH に溶解し逆相 HPLC にて分取精製 (column : YMC-Pack ODS A323, 10×250 mm, 25% CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA)、凍結乾燥して標記化合物を得た。

HPLC: Rt = 16.43 min (条件は工程 1-6 と同じ)

FAB-MS: m/z = 577 (M<sup>+</sup>)

(実施例 2) HDA-17; cyclo(-Aaz(NHOH)-Phe-Phe-D-Pro-)

下記式 (XI) :

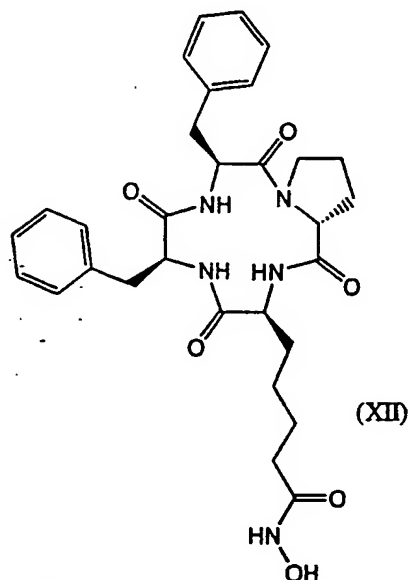


で示される環状テトラペプチド HDA-17 ; cyclo(-Aaz(NHOH)-Phe-Phe-D-Pro-)の合成工程を簡単に述べる。実施例 1 に記載する工程 1-2 に引き続き、工程 1-3 に準じて、Boc-Asu(OBzl)-OH に換え Boc-Aaz(OBzl)-OH を用いて、鎖状テトラペプチド Boc-Aaz(OBzl)-Phe-Phe-D-Pro-OtBu を調製した。それ以降、工程 1-4～工程 1-7 の手法を適用して、脱保護、環化反応、側鎖カルボン酸のヒドロキサム酸構造（ヒドロキシアミノカルボニル構造）への変換を行い、標記環状テトラペプチドを得た。

FAB-MS:  $m/z = 591$  ( $M^+$ )

(実施例 3) HDA-18 ; cyclo(-Api(NHOH)-Phe-Phe-D-Pro-)

下記式 (XII) :

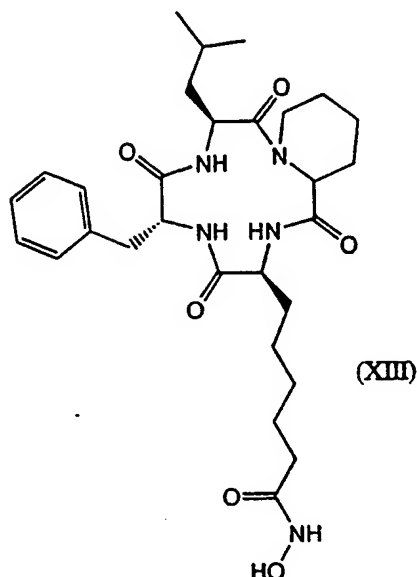


で示される環状テトラペプチド HDA-18 ; cyclo(-Api(NHOH)-Phe-Phe-D-Pro-)の合成工程を簡単に述べる。実施例 1 に記載する工程 1-2 に引き続き、工程 1-3 に準じて、Boc-Asu(OBzl)-OH に換え Boc-API(OBzl)-OH を用いて、鎖状テトラペプチド Boc-API(OBzl)-Phe-Phe-D-Pro-OtBu を調製した。それ以降、工程 1-4～工程 1-7 の手法を適用して、脱保護、環化反応、側鎖カルボン酸のヒドロキサム酸構造（ヒドロキシアミノカルボニル構造）への変換を行い、標記環状テトラペプチドを得た。

FAB-MS:  $m/z = 563$  ( $M^+$ )

(実施例 4) HDA-12 ; cyclo(-Asu(NHOH)-D-Phe-Leu-Pip-)

下記式 (XIII) :

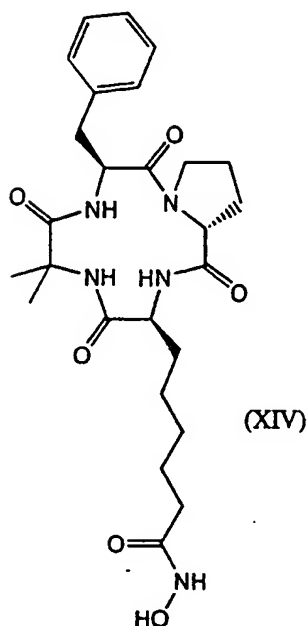


で示される環状テトラペプチド HDA-12 ; cyclo(-Asu(NHOH)-D-Phe-Leu-Pip-)の合成工程を簡単に述べる。実施例 1 の工程 1-1 に準じて、Z-Leu-OH と H-DL-Pip-OtBu から Z-Leu-DL-Pip-OtBu を調製した。実施例 1 の工程 1-2 に準じて、Z-Leu-DL-Pip-OtBu と Z-D-Phe-OH から Z-D-Phe-Leu-DL-Pip-OtBu を調製した。次いで、実施例 1 の工程 1-3 に準じて、Z-D-Phe-Leu-DL-Pip-OtBu と Boc-Asu(OBzl)-OH から、鎖上テトラペプチド Boc-Asu(OBzl)-D-Phe-Leu-DL-Pip-OtBu を得た。以降、工程 1-4～工程 1-7 の手法を適用して、脱保護、環化反応、側鎖カルボン酸のヒドロキسام酸構造（ヒドロキシアミノカルボニル構造）への変換を行い、標記環状テトラペプチドを得た。

FAB-MS:  $m/z = 559$  ( $M^+$ )

(実施例 5) HDA-15 ; cyclo(-Asu(NHOH)-Aib-Phe-D-Pro-)

下記式 (XIV) :



で示される環状テトラペプチド HDA-15 ;  $\text{cyclo}(-\text{Asu}(\text{NHOH})-\text{Aib}-\text{Phe}-\text{D}-\text{Pro}-)$  の合成工程を簡単に述べる。実施例 1 の工程 1-1 に引き続き、工程 1-2 に準じて、Z-Phe-OH に換えて Z-Aib-OH を用いて、Z-Aib-Phe-D-Pro-OtBu を調製した。次いで、工程 1-3 に準じて、Z-Aib-Phe-D-Pro-OtBu と Boc-Asu(OBzl)-OH から、環状テトラペプチド Boc-Asu(OBzl)-Aib-Phe-D-Pro-OtBu を得た。以降、工程 1-4～工程 1-7 の手法を適用して、脱保護、環化反応、側鎖カルボン酸のヒドロキサム酸構造（ヒドロキシアミノカルボニル構造）への変換を行い、標記環状テトラペプチドを得た。

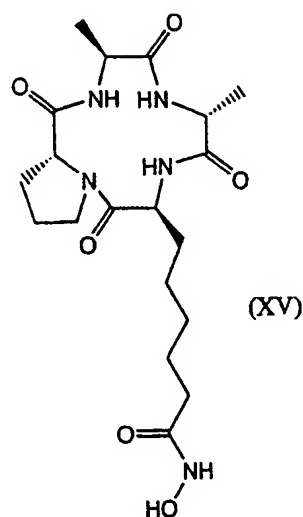
FAB-MS:  $m/z = 517 (M^+)$

(参考例 1) HDA-19 ;  $\text{cyclo}(-\text{Asu}(\text{NHOH})-\text{Phe}-\text{Phe}-\text{D}-\text{Pro}-)_2$

上記実施例 1 のテトラペプチド(HDA-5)と同じアミノ酸配列が繰り返された構造である、環状オクタペプチド HDA-19 ;  $\text{cyclo}(-\text{Asu}(\text{NHOH})-\text{Phe}-\text{Phe}-\text{D}-\text{Pro}-)_2$  は、実施例 1 の工程 1-3 で得られる Boc-Asu(OBzl)-Phe-Phe-D-Pro-OtBu から、以降同様な手順に従い、環状オクタペプチドに調製した。

(実施例 6) HDA-13 ;  $\text{cyclo}(-\text{L}-\text{Asu}(\text{NHOH})-\text{D}-\text{Pro}-\text{L}-\text{Ala}-\text{D}-\text{Ala}-)$  の合成

下記式 (XV) :



で示される環状テトラペプチド HDA-13 ; *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-D-Pro-L-Ala-D-Ala-)の合成工程を簡単に述べる。

#### 工程 6-1 Boc-L-Asu(OBzl)-D-Pro-OtBu

Boc-L-Asu(OBzl)-OH (1.14 g, 3.0 mmol)、H-D-Pro-OtBu (510 mg, 3.0 mmol) および HOBt  $\cdot$  H<sub>2</sub>O (505 mg, 3.3 mmol)を DMF (7 ml)に溶解し、氷冷下 DCC (681 mg, 3.3 mmol)を加え、終夜室温で攪拌した。反応液を濾過、濃縮後、酢酸エチルに再溶解し、10% クエン酸、4% NaHCO<sub>3</sub> および飽和食塩水で順次洗浄した。無水 MgSO<sub>4</sub> 上で乾燥後、濃縮、残渣をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub>)で精製し、標記化合物 1.51 g (94%)を油状物質として得た。

R<sub>f</sub> = 0.61 (CHCl<sub>3</sub> / MeOH = 9 / 1)

#### 工程 6-2 Boc-L-Ala-D-Ala-OH

H-D-Ala-OH (668 mg, 7.5 mmol)の水溶液 (5 ml)に氷冷下 TEA (1.26 ml, 9.0 mmol)を加え、これに Boc-L-Ala-Osu (1.43 g, 5.0 mmol)の DMF 溶液 (10 ml)を混合し、終夜室温で攪拌した。反応液を濃縮した後、残渣を NaHCO<sub>3</sub> 水溶液に溶解し、水相を酢酸エチルで洗浄した。クエン酸にて水相を酸性にして、酢酸エチルで抽出し、有機相を飽和食塩水で洗浄した。無水 MgSO<sub>4</sub> 上で乾燥後、濃縮、残渣にジエチルエーテル / 石油エーテル (1 / 5)を加え固化し、標記化合物 890 mg (68%)を白色粉末状物質として得た。



Rf = 0.40 (CHCl<sub>3</sub> / MeOH / 酢酸 = 90 / 10 / 2)

#### 工程 6-3 Boc-L-Ala-D-Ala-L-Asu(OBzl)-D-Pro-OtBu

Boc-L-Asu(OBzl)-D-Pro-OtBu (1.4 g, 2.63 mmol)に氷冷下 TFA (3 ml)を加え、そのまま 20 分間放置した。反応液を濃縮し、残渣にジエチルエーテル / 石油エーテル (1 / 5)を加えデカンテーションを行い、H-L-Asu(OBzl)-D-Pro-OtBu TFA (2.0 g, quant)を得た。

これを DMF (10 ml)に溶解し、Boc-L-Ala-D-Ala-OH (810 mg, 3.16 mmol)、HOBt H<sub>2</sub>O (582 mg, 3.8 mmol)、さらに氷冷下 DCC (783 mg, 3.8 mmol)を加え、そのまま終夜撹拌した。反応液を濾過、濃縮後、酢酸エチルに再溶解し、10% クエン酸、4% NaHCO<sub>3</sub> および飽和食塩水で順次洗浄した。無水 MgSO<sub>4</sub> 上で乾燥後、濃縮、残渣をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (1% MeOH / CHCl<sub>3</sub>)で精製し、標記化合物 1.23 g (69%)を油状物質として得た。

Rf = 0.33 (CHCl<sub>3</sub> / MeOH = 9 / 1)

#### 工程 6-4 *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-D-Pro-L-Ala-D-Ala-)

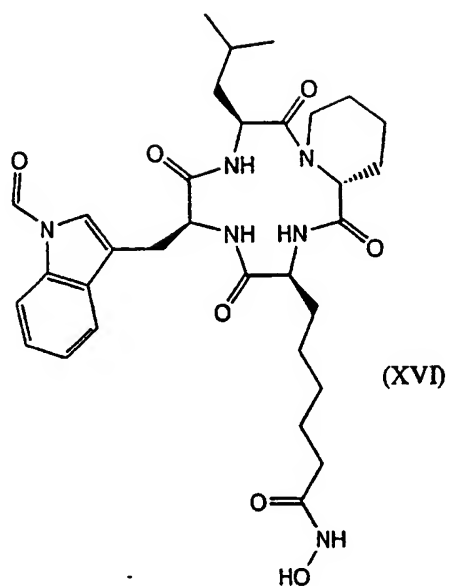
これ以降は、実施例 1 (HDA-5)の工程 1-4~1-7 の手法を適用して、脱保護、環化反応、側鎖カルボン酸のヒドロキサム酸構造 (ヒドロキシアミノカルボニル構造) への変換を行い、標記環状テトラペプチドを得た。

HPLC: Rt = 8.22 min (column: Wako Pak C18, 4.6×150 mm, 0-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml / min)

FAB-MS: m/z = 426 (M + H)<sup>+</sup>

(実施例 7) HDA-16 ; *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-L-Trp(CHO)-L-Leu-D-Pip-)

下記式 (XVI) :



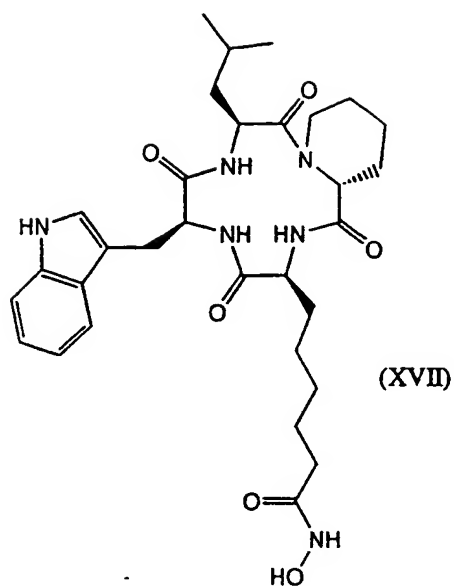
で示される標記環状テトラペプチド HDA-16 ; *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-L-Trp(CHO)-L-Leu-D-Pip-)の合成のは実施例 4 (HDA-12)に記載の方法に準じて行った。

HPLC:  $R_t = 17.34$  min (column: Wako Pak C18, 4.6 x 150 mm, 10-100% linear gradient  $\text{CH}_3\text{CN}$  / 0.1% TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml / min)

FAB-MS:  $m/z = 647$  ( $M + \text{Na}$ )<sup>+</sup>

(実施例 8) HDA-33 ; *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-L-Trp-L-Leu-D-Pip-)

下記式 (XVII) :



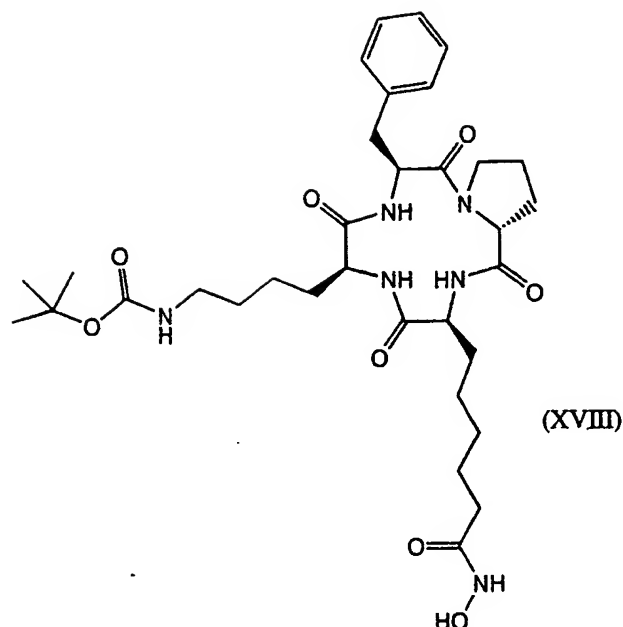
で示される標記環状テトラペプチド HDA-33 ; *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-L-Trp-L-Leu-D-Pip-)の合成は実施例 4 (HDA-12)に記載の方法に準じて行った。

HPLC: Rt = 17.08 min (column: Wako Pak C18, 4.6×150 mm, 0-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml / min)

FAB-MS: m/z = 597 (M + H)<sup>+</sup>

(実施例 9) HDA-32 ; *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-L-Lys(Boc)-L-Phe-D-Pro-)

下記式 (XVIII) :



で示される環状テトラペプチド HDA-32 ; *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-L-Lys(Boc)-L-Phe-D-Pro-)の合成工程を簡単に述べる。

#### 工程 9-1 Boc-L-Asu(OBzl)-L-Lys(Z)-L-Phe-D-Pro-OtBu

実施例 1 (HDA-5)工程 1-1、1-2 に準じて行い Boc-L-Lys(Z)-L-Phe-D-Pro-OtBu を得た。このトリペプチド (1.96 g, 2.88 mmol)に氷冷下 TFA (3 ml)を加え、そのまま 20 分間放置した。反応液を濃縮、酢酸エチルに溶解し、4% NaHCO<sub>3</sub> および飽和食塩水で順次洗浄した。無水 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 上で乾燥後、濃縮し、H-L-Lys(Z)-L-Phe-D-Pro-OtBu (1.32 g, 79%)を得た。

これを DMF (10 ml)に溶解し、Boc-L-Asu(OBzl)-OH (1.07 g, 2.81 mmol)、HOBT H<sub>2</sub>O (502 mg, 3.28 mmol)、さらに氷冷下 DCC (677 mg, 3.28 mmol)を加え、そのまま終夜攪拌した。反応液を濾過、濃縮後、酢酸エチルに再溶解し、10% クエン酸、4% NaHCO<sub>3</sub> および飽和食塩水で順次洗浄した。無水 MgSO<sub>4</sub> 上で乾燥後、濃縮、残渣をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (1% MeOH / CHCl<sub>3</sub>)で精製し、標記化合物 1.55 g (72%)を泡状物質として得た。

R<sub>f</sub> = 0.80 (CHCl<sub>3</sub> / MeOH = 9 / 1)

工程 9-2 *cyclo* (-L-Asu-L-Lys(Boc)-L-Phe-D-Pro-)

工程 9-1 で得られた化合物 Boc-L-Asu(OBzl)-L-Lys(Z)-L-Phe-D-Pro-OtBu を実施例 1 (HDA-5) の工程 1-4~1-6 の手法を適用して、Boc 基の除去、環化反応を行った。この保護環状テトラペプチド (98 mg, 0.128 mmol) を酢酸 (3 ml) に溶解し、5% Pd-C (30 mg) を用いて、水素雰囲気下で 4 時間攪拌した。反応液を濾過、濃縮し、*cyclo* (-L-Asu-L-Lys-L-Phe-D-Pro-) を得た。

これをジオキサン (2 ml) と水 (2 ml) の混合溶媒に溶解し、NaHCO<sub>3</sub> で pH8 に調整した。これに氷冷下 Boc<sub>2</sub>O (42 mg) のジオキサン溶液を加え、終夜攪拌した。反応液を濃縮後、酢酸エチルに再溶解し、10% クエン酸、および飽和食塩水で順次洗浄した。無水 MgSO<sub>4</sub> 上で乾燥後、濃縮し、標記化合物 61 mg (74%) を得た。

工程 9-3 *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-L-Lys(Boc)-L-Phe-D-Pro-)

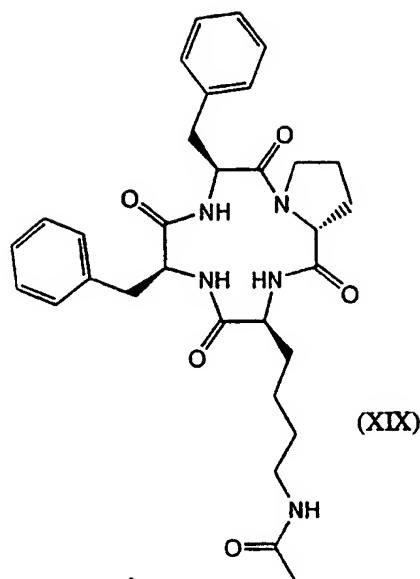
これ以降は、実施例 1 (HDA-5) の工程 1-7 の手法を適用して、側鎖カルボン酸のヒドロキサム酸構造 (ヒドロキシアミノカルボニル構造) への変換を行い、標記環状テトラペプチドを得た。

HPLC: Rt = 17.15 min (column: Wako Pak C18, 4.6×150 mm, 10-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml / min)

FAB-MS: m/z = 659 (M + H)<sup>+</sup>

(実施例 10) HDA-6; *cyclo* (-L-Lys(Ac)-L-Phe-L-Phe-D-Pro-)

下記式 (XIX) :



で示される環状テトラペプチド HDA-6 ; *cyclo* (-L-Lys(Ac)-L-Phe-L-Phe-D-Pro-) の合成工程を簡単に述べる。

工程 10-1 *cyclo* (-L-Lys-L-Phe-L-Phe-D-Pro-)·HCl

実施例 1 (HDA-5)に記載する工程 1-1~1-6 の手法を適用し、*cyclo* (-L-Lys(Z)-L-Phe-L-Phe-D-Pro-)を得た。これを酢酸中接触還元後、酢酸塩を塩酸塩に置換し、標記化合物を得た。

FAB-MS:  $m/z = 556 (M+H)^+$

工程 10-2 *cyclo* (-L-Lys(Ac)-L-Phe-L-Phe-D-Pro-)

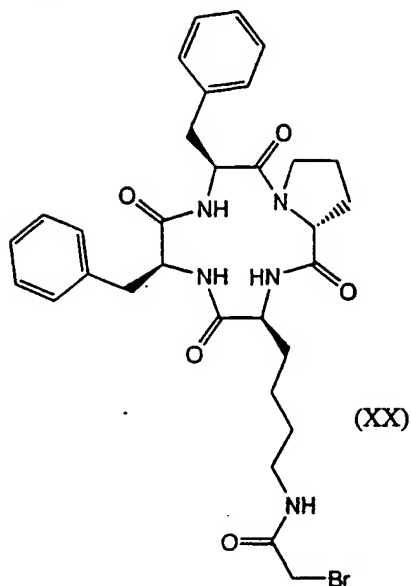
工程 10-1 で得られた *cyclo* (-L-Lys-L-Phe-L-Phe-D-Pro-)·HCl (44 mg, 80  $\mu$ mol) の DMF 溶液 (2 ml) に氷冷下、TEA (33  $\mu$ l, 0.24  $\mu$ mol) および無水酢酸 (12  $\mu$ l, 0.12  $\mu$ mol) を加え、2 時間攪拌した。反応液に酢酸を加えて中和し、濃縮した。粗ペプチドを逆相 HPLC にて分取精製 (column: YMC-Pack ODS A-323, 10 x 250 mm, 30% CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA)、凍結乾燥して標記化合物 57 mg (quant) を得た。

HPLC:  $R_t = 16.68$  min (column: Wako Pak C18, 4.6 x 150 mm, 10-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml / min)

FAB-MS:  $m/z = 562 (M+H)^+$

(実施例 11) HDA-26 ; *cyclo* (-L-Lys(BrAc)-L-Phe-L-Phe-D-Pro-)

下記式 (XX) :



で示される環状テトラペプチド HDA-26 ; *cyclo* (-L-Lys(BrAc)-L-Phe-L-Phe-D-Pro-)の合成工程を簡単に述べる。

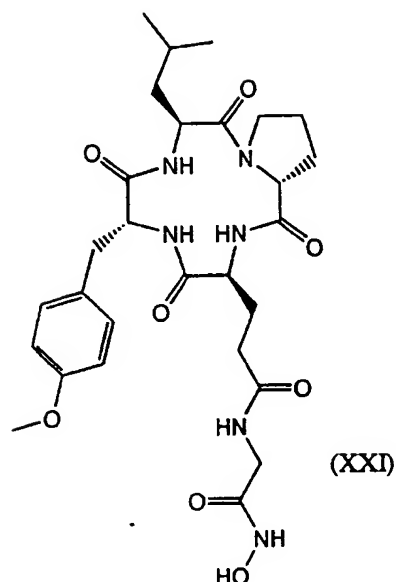
実施例 10 (HDA-6) の工程 10-1 を適用して得られる *cyclo* (-L-Lys-L-Phe-L-Phe-D-Pro-) HCl (50 mg, 90  $\mu$ mol) とプロモ酢酸 (19 mg, 0.135 mmol) を DMF (1 ml) に溶解し、氷冷下 TEA (19 ml, 0.135 mmol) および DCC (28 mg, 0.135 mmol) を加え、終夜攪拌した。反応液を濾過、濃縮後、酢酸エチルに再溶解し、10% クエン酸、4% NaHCO<sub>3</sub> および飽和食塩水で順次洗浄した。無水 MgSO<sub>4</sub> 上で乾燥後、濃縮、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製し、標記化合物 36 mg (62%) を油状物質として得た。

HPLC: Rt = 17.62 min (column: Wako Pak C18, 4.6 $\times$ 150 mm, 10-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml / min)

FAB-MS: m/z = 640 (M+H)<sup>+</sup>, 642 (M + 3)<sup>+</sup>

(実施例 12) HDA-34 ; *cyclo* (-L-Glu(Gly-NHOH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-)

下記式 (XXI) :



で示される環状テトラペプチド HDA-34 ; *cyclo* (-L-Glu(Gly-NHOH))-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-)の合成工程を簡単に述べる。

#### 工程 12-1 Boc-L-Glu-OAll

Boc-L-Glu-OH (2.47 g, 10.0 mmol)の THF (20 ml)溶液に氷冷下にて DCC (2.27 g, 11.0 mmol)を加え、そのまま 2 時間攪拌した。反応液を濾過し、その濾液にアリルアルコール (1.02 ml, 20.0 mmol)およびジシクロヘキシルアミン (2.39 ml, 12.0 mmol)を加え、終夜攪拌した。反応液を濃縮後、エーテル-石油エーテルで洗浄し、標記化合物 3.90 g (83%)を白色粉末状物質として得た。

$R_f = 0.74$  ( $\text{CHCl}_3$  / MeOH / 酢酸 = 90 / 10 / 0.2)

#### 工程 12-2 Boc-L-Glu(Gly-OBzl)-OAll

工程 12-1 で得られた Boc-L-Glu-OAll DCHA (1.62 g, 3.45 mmol)を酢酸エチル (200 ml)に溶解し、10% クエン酸および飽和食塩水で順次洗浄した。無水  $\text{MgSO}_4$  上で乾燥後、濃縮し Boc-L-Glu-OAll を得た。

Boc-L-Glu-OAll (630 mg, 2.19 mmol)、H-Gly-OBzl TosOH (739 mg, 2.19 mmol) および HOBt  $\text{H}_2\text{O}$  (34 mg, 0.22 mmol)を DMF (10 ml)に溶解し、氷冷下 TEA (0.31 ml,



2.19 mmol)および DCC (543 mg, 2.63 mmol)を加え、終夜室温で撹拌した。反応液を濾過、濃縮後、酢酸エチルに再溶解し、10% クエン酸、4% NaHCO<sub>3</sub> および飽和食塩水で順次洗浄した。無水 MgSO<sub>4</sub> 上で乾燥後、濃縮し、フラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (1% MeOH / CHCl<sub>3</sub>) で精製し、標記化合物 343 mg (46%) を油状物質として得た。

HPLC: Rt = 23.75 min (column: Wako Pak C18, 4.6×150 mm, 10-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml / min)

#### 工程 12-3 Boc-L-Ile-D-Pro-OBzl

Boc-L-Ile-OH 1/2 H<sub>2</sub>O (1.13 g, 4.7 mmol)、H-D-Pro-OBzl HCl (1.14 g, 4.7 mmol) および HOBT H<sub>2</sub>O (72 mg, 0.47 mmol) を DMF (10 ml) に溶解し、氷冷下 TEA (0.66 ml, 4.7 mmol) および DCC (1.16 g, 5.64 mmol) を加え、終夜室温で撹拌した。反応液を濾過、濃縮後、酢酸エチルに再溶解し、10% クエン酸、4% NaHCO<sub>3</sub> および飽和食塩水で順次洗浄した。無水 MgSO<sub>4</sub> 上で乾燥後、濃縮し、フラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (1% MeOH / CHCl<sub>3</sub>) で精製し、標記化合物 1.76 g (89%) を油状物質として得た。

Rf = 0.32 (CHCl<sub>3</sub> / MeOH = 49 / 1)

#### 工程 12-4 Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl

工程 12-3 で得られた化合物 Boc-L-Ile-D-Pro-OBzl (967 mg, 2.31 mmol) をジオキサン (12 ml) に溶解し、4N HCl / ジオキサン (12 ml) を加え、室温で 1.5 時間静置した。反応液を濃縮し、残渣にジエチルエーテル / 石油エーテル (1 / 3) を加えデカンテーションを行い、H-L-Ile-D-Pro-OBzl HCl (745 mg, 91%) を得た。

これを DMF (10 ml) に溶解し、Boc-D-Tyr(Me)-OH (620 mg, 2.10 mmol)、HOBT H<sub>2</sub>O (322 mg, 2.10 mmol)、さらに氷冷下 TEA (0.63 ml, 4.53 mmol) および BOP (1.05 g, 2.36 mmol) を加え、そのまま 2 時間撹拌した。反応液を濃縮後、酢酸エチルに再溶解し、10% クエン酸、4% NaHCO<sub>3</sub> および飽和食塩水で順次洗浄した。無水 MgSO<sub>4</sub> 上で乾燥後、濃縮、粗ペプチドをフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (1% MeOH / CHCl<sub>3</sub>) で精製し、標記化合物 881 mg (72%) を油状物質として得た。

HPLC: Rt = 21.87 min (column: Wako Pak C18, 4.6×150 mm, 37-100% linear

gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml / min)

#### 工程 12-5 Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OH

工程 12-4 で得られた化合物 Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl (881 mg, 1.44 mmol) を MeOH (5 ml) に溶解し、5% Pd-C (70 mg) を用いて、水素雰囲気下で終夜撹拌した。反応液を濾過、濃縮し、標記化合物を得た。

R<sub>f</sub> = 0.69 (CHCl<sub>3</sub> / MeOH / 酢酸 = 90 / 10 / 2)

#### 工程 12-6 Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-L-Glu(Gly-OBzl)-OAl1

工程 12-2 で得られた化合物 Boc-L-Glu(Gly-OBzl)-OAl1 (200 mg, 0.46 mmol) をジオキサン (3 ml) に溶解し、4N HCl / ジオキサン (3 ml) を加え、室温で 1.5 時間静置した。反応液を濃縮し、残渣にジエチルエーテル / 石油エーテル (1 / 3) を加えデカンテーションを行い、H-L-Glu(Gly-OBzl)-OAl1 HCl (171 mg, quant) を得た。

これを DMF (5 ml) に溶解し、Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OH (233 mg, 0.46 mmol)、HOBt H<sub>2</sub>O (70 mg, 0.46 mmol)、さらに氷冷下 TEA (0.17 ml, 1.20 mmol) および BOP (305 mg, 0.69 mmol) を加え、そのまま終夜撹拌した。反応液を濃縮後、酢酸エチルに再溶解し、10% クエン酸、4% NaHCO<sub>3</sub> および飽和食塩水で順次洗浄した。無水 MgSO<sub>4</sub> 上で乾燥後、濃縮し、粗ペプチドをフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (2% MeOH / CHCl<sub>3</sub>) で精製し標記化合物 300 mg (79%) を油状物質として得た。

HPLC: Rt = 20.99 min (column: Wako Pak C18, 4.6×150 mm, 37-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml / min)

FAB-MS: m/z = 822 (M + H)<sup>+</sup>

#### 工程 12-7 *cyclo* (-L-Glu(Gly-NHOH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-)

工程 12-6 で得られた Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-L-Glu(Gly-OBzl)-OAl1 (300 mg, 0.37 mmol) を CHCl<sub>3</sub> / 酢酸 / N-メチルモルフォリン (37 / 2 / 1) (11 ml) に溶解し、Ar ガスで反応容器内を置換した。これに Pd(0)(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (1.27 g, 1.1 mmol) を加え Ar 雰囲気下終夜撹拌した。反応液を濃縮後、酢酸エチルに再溶解し、

10% クエン酸および飽和食塩水で順次洗浄した。無水  $\text{MgSO}_4$  上で乾燥後、濃縮し、 $\text{Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-L-Glu(Gly-OBzl)-OH}$  を得た。

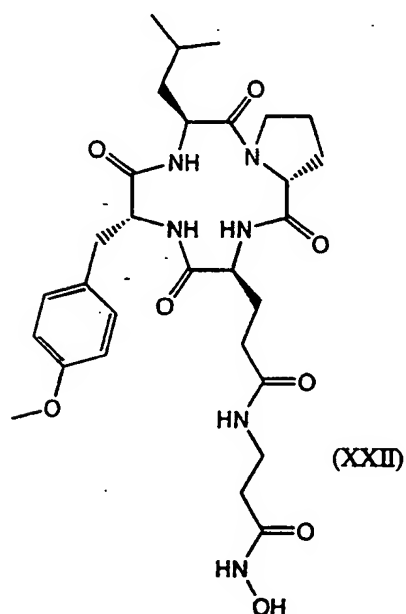
これ以降は実施例 1(HDA-5)の工程 1-4~1-7 の手法を適用して、脱保護、環化反応、側鎖カルボン酸のヒドロキサム酸構造 (ヒドロキシアミノカルボニル構造) への変換を行い、標記環状テトラペプチドを得た。

HPLC:  $R_t = 15.55 \text{ min}$  (column: Wako Pak C18,  $4.6 \times 150 \text{ mm}$ , 10-100% linear gradient  $\text{CH}_3\text{CN} / 0.1\% \text{ TFA}$  over 30 min, flow rate  $1.0 \text{ ml / min}$ )

FAB-MS:  $m/z = 589 \text{ (M + H)}^+$

(実施例 1 3) HDA-3 5 ; *cyclo* (-L-Glu(b-Ala-NHOH))-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-)

下記式 (XXII) :



で示される標記環状テトラペプチド HDA-3 5 ; *cyclo* (-L-Glu(b-Ala-NHOH))-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-)の合成は、実施例 1 2 の工程 12-2 に記載の方法に準じて、 $\text{Boc-L-Glu(b-Ala-OBzl)-OAlI}$  を調製し、次いで、工程 12-3~12-7 の手順に準じて、当該環状テトラペプチドを得た。

HPLC:  $R_t = 15.28 \text{ min}$  (column: Wako Pak C18,  $4.6 \times 150 \text{ mm}$ , 10-100% linear

gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml / min)

FAB-MS: m/z = 603 (M + H)<sup>+</sup>

(参考例 2) HDA-7 ; *cyclo* (-L-Lys(Ac)-L-Phe-L-Phe-D-Pro-)<sub>2</sub> の合成

実施例 10 の HDA-6 と同じアミノ酸配列が繰り返された構造である、環状オクタペプチド HDA-7 は、実施例 10 (HDA-6) の工程 10-1 中、実施例 1 の工程 1-3 に相当する中間工程で得られる Boc-L-Lys(Z)-L-Phe-L-Phe-D-Pro-OtBu から、以降同様な手順に従い、標記環状オクタペプチドを得た。

HPLC: Rt = 16.10 min (column: MS GEL C18, 4.6×150 mm, 10-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml / min)

FAB-MS: m/z = 1124 (M+H)<sup>+</sup>

(参考例 3) HDA-14 ; *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-)<sub>2</sub> の合成

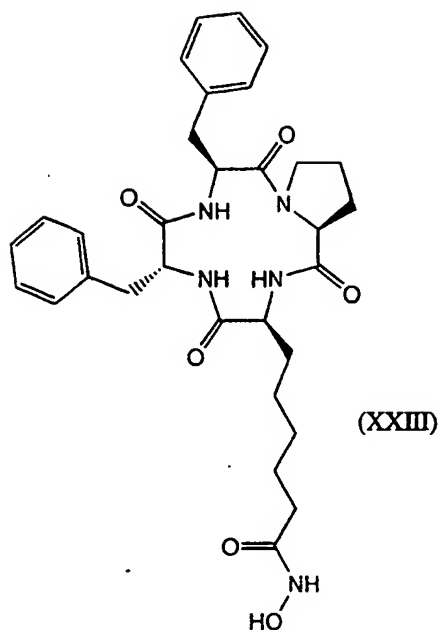
後述する実施例 18 の HDA-30 と同じアミノ酸配列が繰り返された構造である、環状オクタペプチド HDA-14 は、実施例 1 (HDA-5) の手法を適用して、Boc-L-Asu(NHOH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-OtBu を調製し、標記環状オクタペプチドを得た。

HPLC: Rt = 20.59 min (column: Wako Pak C18, 4.6×150 mm, 10-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml / min)

FAB-MS: m/z = 1170 (M+Na)<sup>+</sup>

(実施例 14) HDA-38 ; *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-D-Phe-L-Phe-L-Pro-)

下記式 (XXIII) :



で示される環状テトラペプチド HDA-38 ; *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-D-Phe-L-Phe-L-Pro-) の合成工程を簡単に述べる。

#### 工程 14-1 *cyclo* (-L-Asu(OBzl)-D-Phe-L-Phe-L-Pro-)

Boc-L-Asu(OBzl)-OH (380 mg, 1.0 mmol) とオキシム樹脂 (OxR, 1.0 g) を DCM (15 ml) 中で DCC (206 mg, 1.0 mmol) を用いて縮合した。導入率 0.47 mmol / g resin. この樹脂 1 g を用いて Boc-ストラテジーによる固相合成の常法で、順次、Boc-L-Pro-OH、Boc-L-Phe-OH、および Boc-D-Phe-OH を縮合し、Boc-D-Phe-L-Phe-L-Pro-L-Asu(OBzl)-OxR を得た。次いで、脱 Boc 後、DMF (15 ml) の懸濁液に 2 等量ずつの酢酸 (57 ml, 1.0 mmol)、DIEA (0.15 ml, 1.0 mmol) を加えて 20 時間反応容器を振盪した。反応液を濾過、濃縮後、残渣に水を加え固化し、標記環状テトラペプチド化合物 110 mg (38%) を白色粉末状物質として得た。

HPLC: Rt = 15.72 min (column: Wako Pak C4, 4.6 × 150 mm, 37-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min)

#### 工程 14-2 *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-D-Phe-L-Phe-L-Pro-)

以下、実施例 1 (HDA-5) の製造方法中、工程 1-6 および 1-7 と同様に、Pd-C

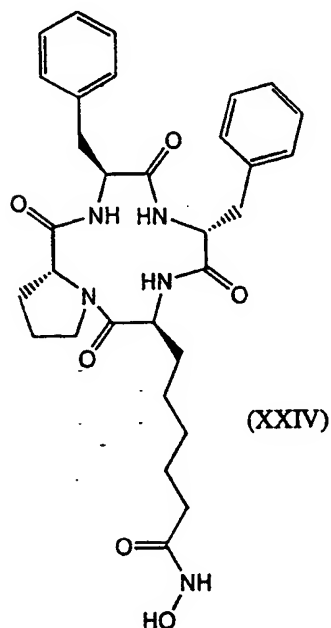
を用い DMF 中で接触還元後、ヒドロキシルアミンと縮合した。反応液を濃縮後、DMSO に溶解し逆相 HPLC にて分取精製 (column: YMC-Pack ODS A-323, 10 x 250 mm, 36% CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA)、凍結乾燥して標記化合物 9 mg (10%)を得た。

HPLC: Rt = 16.94 min (column: MS GEL C18, 4.6×150 mm, 10-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min)

FAB-MS: m/z = 578 (M+H)<sup>+</sup>

(実施例 15) HDA-37; *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-D-Pro-L-Phe-D-Phe-)

下記式 (XXIV) :



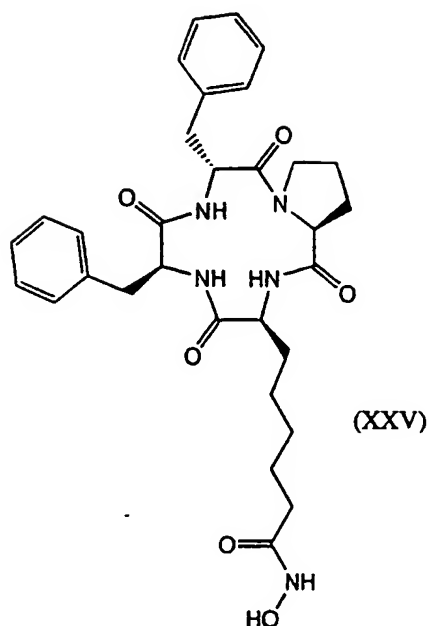
で示される環状テトラペプチド HDA-37; *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-D-Pro-L-Phe-D-Phe-)の合成は、Boc-L-Phe-OxR を出発原料として、実施例 14 に記載の方法に準じて、当該環状テトラペプチドを得た。

HPLC: Rt = 17.65 min (column: MS GEL C18, 4.6×150 mm, 10-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml / min)

FAB-MS: m/z = 578 (M + H)<sup>+</sup>

(実施例 16) HDA-39; *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-L-Phe-D-Phe-L-Pro-)

下記式 (XXV) :



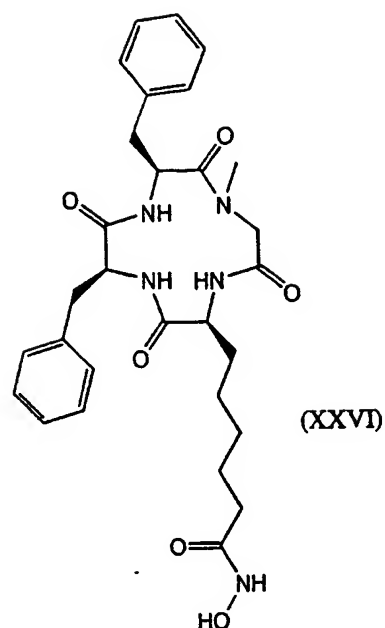
で示される環状テトラペプチド HDA-39 ; *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-L-Phe-D-Phe-L-Pro-) の合成は、Boc-L-Asu(OBzl)-OxR を出発原料として、実施例 14 に記載の方法に準じて、当該環状テトラペプチドを得た。

HPLC: Rt = 16.16 min (column: Wako Pak C18, 4.6×150 mm, 10-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml / min)

FAB-MS: m/z = 578 (M + H)<sup>+</sup>

(実施例 17) HDA-40 ; *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-L-Phe-L-Phe-Sar-)

下記式 (XXVI) :



で示される環状テトラペプチド HDA-40 ; *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-L-Phe-L-Phe-Sar-) の合成は、Boc-L-Asu(OBzl)-OxR を出発原料として、実施例 14 に記載の方法に準じて、当該環状テトラペプチドを得た。

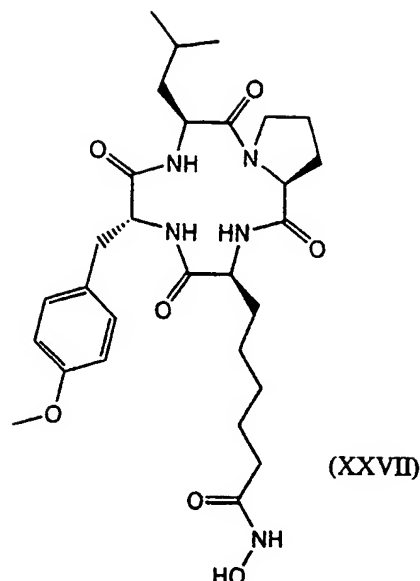
HPLC:  $R_t = 15.86$  min (column: Wako Pak C18,  $4.6 \times 150$  mm, 10-100% linear gradient  $\text{CH}_3\text{CN}$  / 0.1% TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml / min)

FAB-MS:  $m/z = 552$  ( $M + H$ )<sup>+</sup>

(実施例 18) HDA-30 ; *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-)

下記式 (XXVII) :





で示される環状テトラペプチド HDA-30 ; *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-)の合成工程を簡単に述べる。

#### 工程 18-1 Boc-L-Ile-L-Pro-L-Asu(OBzl)-D-Tyr(Me)-OH

Boc-L-Tyr(Me)-OH (591 mg, 2.0 mmol)とオキシム樹脂 (OxR, 2.0 g)をトルエン (30 ml)中でDCC (412 mg, 2.0 mmol)を用いて縮合した。導入率 0.36 mmol / g resin。この樹脂 1 g を用いて Boc-ストラテジーによる固相合成の常法で、順次、Boc-L-Asu(OBzl)-OH、Boc-L-Pro-OH、および Boc-L-Ile-OH を縮合し、Boc-L-Ile-L-Pro-L-Asu(OBzl)-D-Tyr(Me)-OxR を得た。次いで、DMF (15 ml)の懸濁液に 1-ヒドロキシピペリジン (182 mg, 1.80 mmol)を加えて 24 時間反応容器を振盪した。反応液を濾過、濃縮後、酢酸 (7 ml)に溶解し、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  (312 mg, 1.80 mmol)を加え、1 時間攪拌した。反応液を濃縮後、酢酸エチルに再溶解し、10% クエン酸、および飽和食塩水で順次洗浄した。無水  $\text{MgSO}_4$  上で乾燥後、濃縮し、標記鎖状テトラペプチド化合物 368 mg (quant)を油状物質として得た。

HPLC: Rt = 17.45 min (column: Wako Pak C4, 4.6×150 mm, 37-100% linear gradient  $\text{CH}_3\text{CN}$  / 0.1% TFA over 30 min)

#### 工程 18-2 H-L-Ile-L-Pro-L-Asu(OBzl)-D-Tyr(Me)-OH TFA

工程 18-1 で得られた化合物 Boc-L-Ile-L-Pro-L-Asu(OBzl)-D-Tyr(Me)-OH (368 mg, 0.48 mmol) に氷冷下 TFA (3 ml) を加え、そのまま 30 分間放置した。反応液を濃縮し、残渣にジエチルエーテル / 石油エーテルを加え固化し、標記化合物 338 mg (90%) を白色粉末状物質として得た。

工程 18-3 *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-)

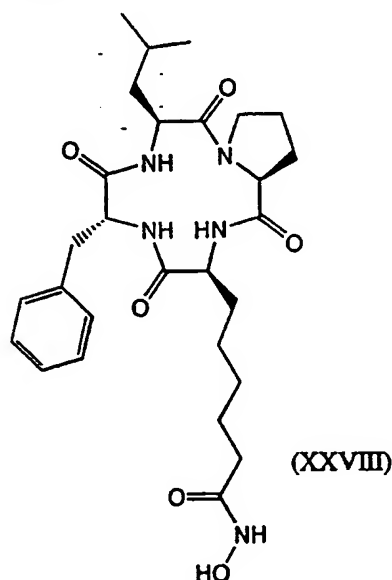
これ以降は実施例 1 (HDA-5) の工程 1-5~1-7 の手法を適用して、環化反応、側鎖カルボン酸のヒドロキサム酸構造 (ヒドロキシアミノカルボニル構造) への変換を行い、標記環状テトラペプチドを得た。

HPLC: Rt = 17.18 min (column: Wako Pak C18, 4.6×150 mm, 10-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml / min)

FAB-MS: m/z = 574 (M + H)<sup>+</sup>

(実施例 19) HDA-28 ; *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-D-Phe-L-Leu-L-Pro-)

下記式 (XXVIII) :



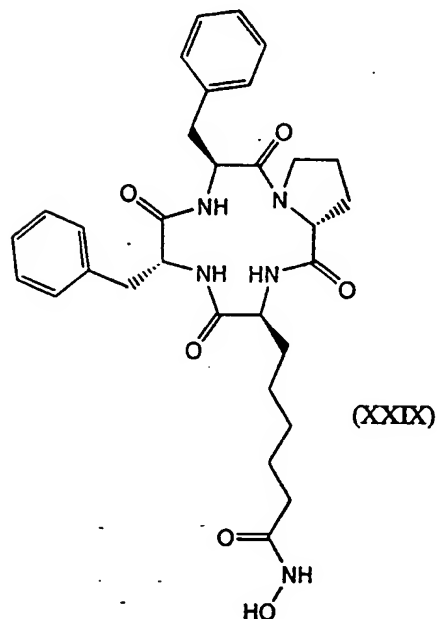
で示される環状テトラペプチド HDA-28 ; *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-D-Phe-L-Leu-L-Pro-) の合成は、Boc-D-Phe-OxR を出発原料として、実施例 18 に記載の方法に準じて、当該環状テトラペプチドを得た。

HPLC: Rt = 17.50 min (column: Wako Pak C18, 4.6×150 mm, 10-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml / min)

FAB-MS: m/z = 544 (M + H)<sup>+</sup>

(実施例 20) HDA-27; *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-D-Phe-L-Phe-D-Pro-)

下記式 (XXIX) :



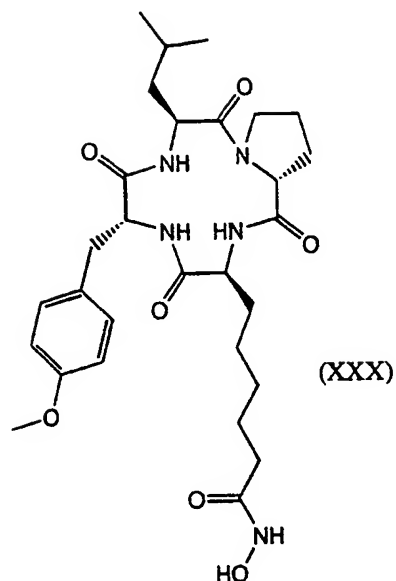
で示される環状テトラペプチド HDA-27; *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-D-Phe-L-Phe-D-Pro-)の合成は、Boc-D-Phe-OxRを出発原料として、実施例 18に記載の方法に準じ、当該環状テトラペプチドを得た。

HPLC: Rt = 19.35 min (column: Wako Pak C18, 4.6 × 150 mm, 10-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml / min)

FAB-MS: m/z = 578 (M + H)<sup>+</sup>

(実施例 21) HDA-31; *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-)

下記式 (XXX) :



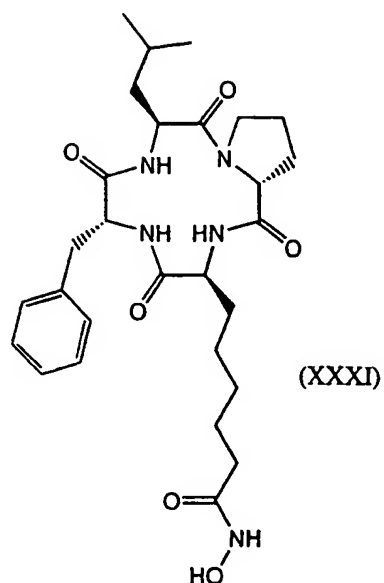
で示される環状テトラペプチド HDA-31; *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) の合成は、Boc-D-Tyr(Me)-OxR を出発原料として、実施例 18 に記載の方法に準じ、当該環状テトラペプチドを得た。

HPLC:  $R_t = 18.63$  min (column: Wako Pak C18,  $4.6 \times 150$  mm, 10-100% linear gradient  $\text{CH}_3\text{CN}$  / 0.1% TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml / min)

FAB-MS:  $m/z = 574$  ( $M + H$ )<sup>+</sup>

(実施例 22) HDA-29; *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-D-Phe-L-Leu-D-Pro-)

下記式 (XXXI) :



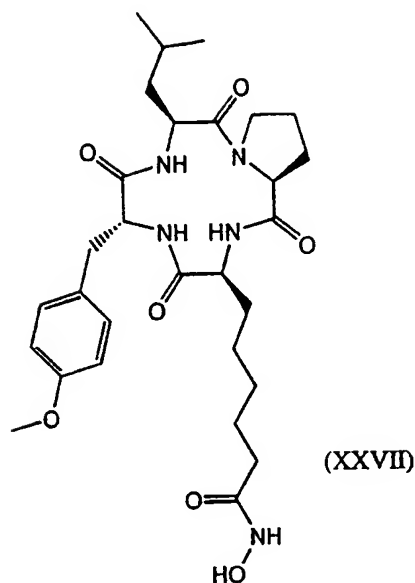
で示される環状テトラペプチド HDA-29 ; *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-D-Phe-L-Leu-D-Pro-)の合成は、Boc-D-Phe-OxRを出発原料として、実施例18に記載の方法に準じ、当該環状テトラペプチドを得た。

HPLC: Rt = 17.88 min (column: Wako Pak C18, 4.6×150 mm, 10-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml / min)

FAB-MS: m/z = 544 (M + H)<sup>+</sup>

(実施例23) HDA-30 ; *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-)

下記式 (XXVII) :



で示される環状テトラペプチド HDA-30 ; *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-) の別法による合成工程を簡単に述べる。

#### 工程 23-1 Boc-L-Asu(OBzl)-OTme

Boc-L-Asu(OBzl)-OH (2.38 g, 6.27 mmol), トリメチルシリルエタノール (1.79 ml, 12.53 mmol) の DCM (12 ml) 溶液に氷冷下にて 4-ジメチルアミノピリジン (76 mg, 0.63 mmol) および DCC (1.55 g, 7.52 mmol) を加え、そのまま終夜攪拌した。反応液を濾過、濃縮後、酢酸エチルに再溶解し、10% クエン酸、4% NaHCO<sub>3</sub> および飽和食塩水で順次洗浄した。無水 MgSO<sub>4</sub> 上で乾燥後、濃縮、残渣をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル / ヘキサン = 1 / 4) で精製し、標記化合物 3.18 g (quant) を油状物質として得た。

R<sub>f</sub> = 0.50 (酢酸エチル / ヘキサン = 1 / 4)

#### 工程 23-2 Boc-L-Asu-OTme

工程 23-1 で得られた化合物 Boc-L-Asu(OBzl)-OTme (1.55 g, 3.13 mmol) を THF (6 ml) に溶解し、5% Pd-C (200 mg) 存在下、水素雰囲気下で 3 時間攪拌した。反応混合物を濾過、濃縮し、標記化合物 1.41 g (quant) を油状物質として得た。

R<sub>f</sub> = 0.38 (CHCl<sub>3</sub> / MeOH / 酢酸 = 19 / 1 / 0.2)

工程 23-3 *cyclo* (-L-Asu(NHOH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-)

工程 23-2 で得られた化合物 Boc-L-Asu-OTme (1.30 g, 3.32 mmol) とオキシム樹脂 (3.32 g) を DCM (50 ml) 中で DCC (685 mg, 3.32 mmol) を用いて縮合し Boc-L-Asu(OxR)-OTme を得た。導入率 0.38 mmol / g resin。この樹脂 350 mg (0.13 mmol) を用いて Boc-ストラテジーによる固相合成の常法で、順次、Boc-L-Pro-OH、Boc-L-Ile-OH、および Boc-D-Tyr(Me)-OH を縮合し、Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-L-Asu(OxR)-OTme を得た。

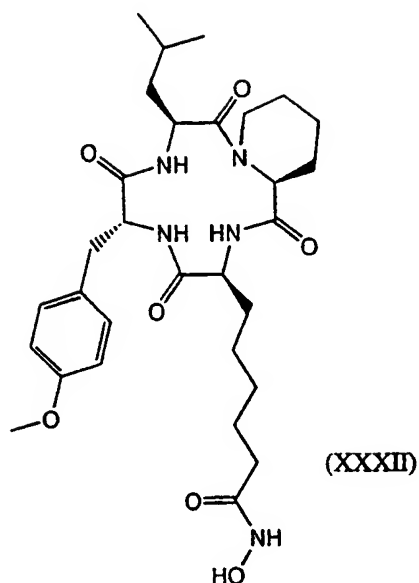
次いでこのペプチド担持樹脂 400 mg を、DMF (6 ml) に懸濁し、1M テトラブチルアンモニウムフルオリドの THF 溶液 (0.76 ml) をシリンジで加えて、室温で 30 分間振盪して、Tme 基を除去、更に DCM 中で Boc 基を除去した。再度 DMF (6 ml) に懸濁し、BOP (176 mg, 0.39 mmol)、HOBt H<sub>2</sub>O (82 mg, 0.52 mmol) および DIEA (93 ml, 0.52 mmol) を加えて、樹脂上で 2 時間環化反応を行った。DMF で洗浄後、*cyclo* (-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-L-Asu(OxR)-) を DMF (6 ml) に懸濁し、ヒドロキシルアミン塩酸塩 (46 mg, 0.65 mmol)、DIEA (0.12 ml, 0.65 mmol) および酢酸 (40 ml, 0.65 mmol) を加えて終夜振盪し、環状テトラペプチドヒドロキサム酸を脱離させた。反応液を濾過、濃縮後、DMF に溶解し逆相 HPLC にて分取精製 (column: YMC-Pack ODS A-323, 10 × 250 mm, 32% CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA)、凍結乾燥して標記化合物 37 mg (50%) を得た。

HPLC: Rt = 17.18 min (column: Wako Pak C18, 4.6 × 150 mm, 10-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml / min)

FAB-MS: m/z = 574 (M+H)<sup>+</sup>

(実施例 24) HDA-49; *cyclo*(-L-Asu(NHOH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pip-)

下記式 (XXXII) :



で示される標記環状テトラペプチド HDA-49 の合成法を簡単に述べる。

Boc-D-Tyr(Me)-OxR を出発原料とし、固相合成法の常法で Boc-L-Ile-L-Pip-L-Asu(OBzl)-D-Tyr(Me)-OxR を調製した。ただし、Boc-L-Ile-OH の縮合には HATU を用いたダブルカップリングを行った。これ以降の工程は、HDA-30; cyclo(-L-Asu(NHOH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-)の実施例 18 に準じ、環化反応、側鎖カルボン酸のヒドロキサム酸構造への変換を行い、を得た。

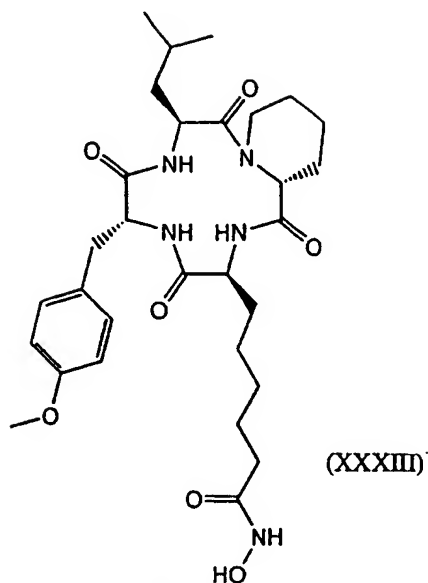
HPLC: Rt = 17.94 min (column: WakoPak C18, 4.6 x 150 mm, 10-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml/min)

FAB-MS: m/z = 588 (M + H)<sup>+</sup>

(実施例 25) HDA-50; cyclo(-L-Asu(NHOH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pip-)

下記式 (XXXIII) :





で示される標記環状テトラペプチド HDA-50 の合成法を簡単に述べる。

Boc-D-Tyr(Me)-OxR を出発原料とし、固相合成法の常法で Boc-L-Ile-D-Pip-L-Asu(OBzl)-D-Tyr(Me)-OxR を調製した。ただし、Boc-L-Ile-OH の縮合には HATU を用いたダブルカップリングを行った。これ以降の工程は、HDA-30; cyclo(-L-Asu(NHOH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-)の実施例 18 に準じ、環化反応、側鎖カルボン酸のヒドロキサム酸構造への変換を行い、標記環状テトラペプチド HDA-50 を得た。

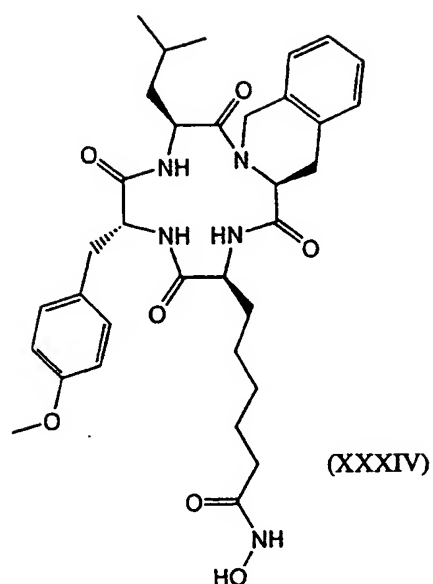
HPLC: Rt = 20.15min (column: WakoPak C18, 4.6 x 150 mm, 10-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml/min)

FAB-MS: m/z = 588 (M + H)<sup>+</sup>

(実施例 26) HDA-51; cyclo(-L-Asu(NHOH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Tic-)

(Tic : 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid)

下記式 (XXXIV) :



で示される標記環状テトラペプチド HDA-51 の合成法を簡単に述べる。

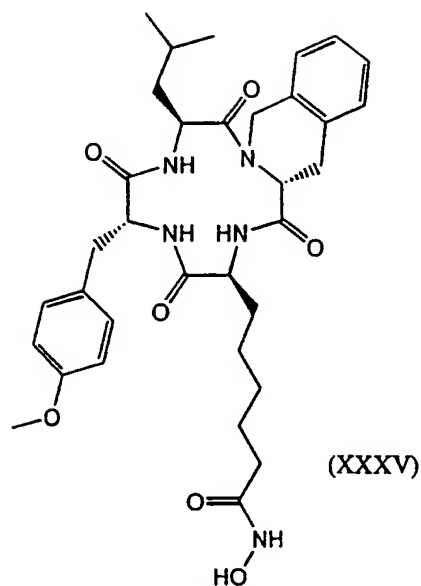
Boc-D-Tyr(Me)-OxR を出発原料とし、固相合成法の常法で Boc-L-Ile-L-Tic-L-Asu(OBzl)-D-Tyr(Me)-OxR を調製した。ただし、Boc-L-Ile-OH の縮合には HATU を用いたダブルカップリングを行った。これ以降の工程は、HDA-30; cyclo(-L-Asu(NHOH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-)の実施例 18 に準じ、環化反応、側鎖カルボン酸のヒドロキサム酸構造への変換を行い、標記環状テトラペプチド HDA-51 を得た。

HPLC: Rt = 18.48 min (column: WakoPak C18, 4.6 x 150 mm, 10-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml/min)

FAB-MS: m/z = 636 (M + H)<sup>+</sup>

(実施例 27) HDA-52; cyclo(-L-Asu(NHOH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Tic-)

下記式 (XXXV) :



で示される標記環状テトラペプチド HDA-52 の合成法を簡単に述べる。

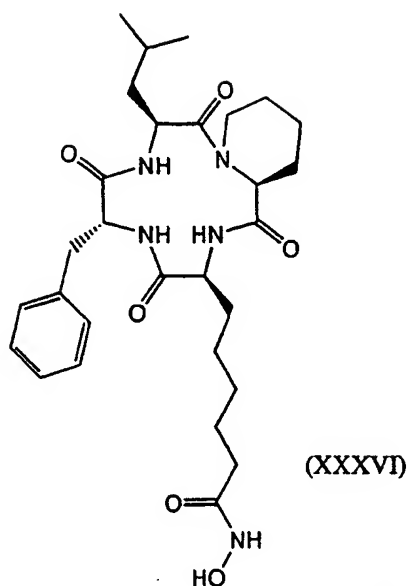
Boc-D-Tyr(Me)-OxR を出発原料とし、固相合成法の常法で Boc-L-Ile-D-Tic-L-Asu(OBzl)-D-Tyr(Me)-OxR を調製した。ただし、Boc-L-Ile-OH の縮合には HATU を用いたダブルカップリングを行った。これ以降の工程は、HDA-30; cyclo(-L-Asu(NHOH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-)の実施例 18 に準じ、環化反応、側鎖カルボンのヒドロキサム酸構造への変換を行い、標記環状テトラペプチド HDA-52 を得た。

HPLC:  $R_t = 20.78$  min (column: WakoPak C18, 4.6 x 150 mm, 10-100% linear gradient  $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$  TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml/min)

FAB-MS:  $m/z = 636$  ( $M + H$ )<sup>+</sup>

(実施例 28) HDA-53; cyclo(-L-Asu(NHOH)-D-Phe-L-Leu-L-Pip-)

下記式 (XXXVI) :



で示される標記環状テトラペプチド HDA-53 の合成法を簡単に述べる。

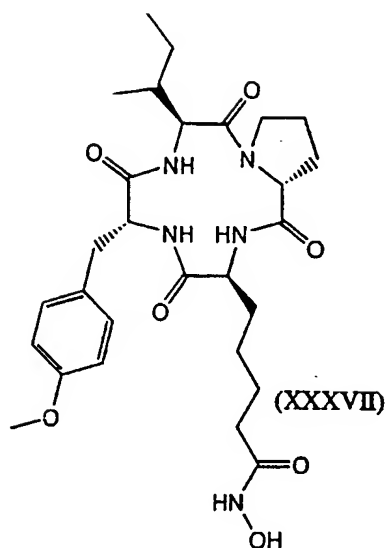
Boc-D-Phe-OxR を出発原料とし、固相合成法の常法で Boc-L-Leu-L-Pip-L-Asu(OBzl)-D-Phe-OxR を調製した。ただし、Boc-L-Leu-OH の縮合には HATU を用いたダブルカップリングを行った。これ以降の工程は、HDA-30; cyclo(-L-Asu(NHOH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-)の実施例 18 に準じ、環化反応、側鎖カルボン酸のヒドロキサム酸構造への変換を行い、標記環状テトラペプチド HDA-53 を得た。

HPLC: Rt = 18.26 min (column: WakoPak C18, 4.6 x 150 mm, 10-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml/min)

FAB-MS: m/z = 558 (M + H)<sup>+</sup>

(実施例 29) HDA-42; cyclo(-L-Api(NHOH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-)

下記式 (XXXVII) :



で示される標記環状テトラペプチド HDA-42 の合成法を簡単に述べる。

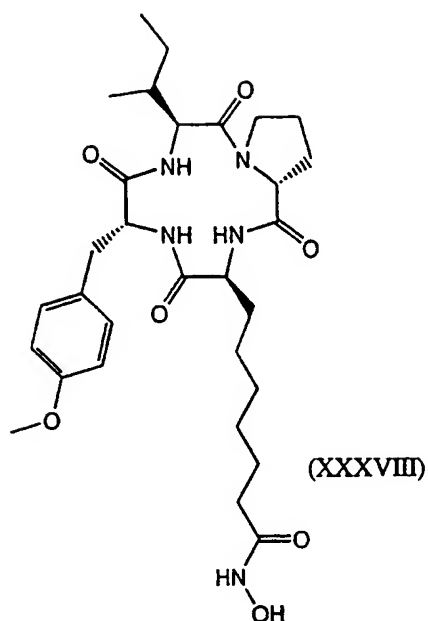
Boc-L-Api(OBzl)-OxR を出発原料とし、HDA-38; cyclo (-L-Asu(NHOH)-D-Phe-L-Phe-L-Pro-) の実施例 14 に準じ、環化反応、側鎖カルボン酸のヒドロキサム酸構造への変換を行い、標記環状テトラペプチド HDA-42 を得た。

HPLC:  $R_t = 17.67$  min (column: WakoPak C18, 4.6 x 150 mm, 10-100% linear gradient  $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$  TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml/min)

FAB-MS:  $m/z = 560$  ( $M + H$ )<sup>+</sup>

(実施例 30) HDA-43; cyclo(-L-Aaz(NHOH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-)

下記式 (XXXVIII) :



で示される標記環状テトラペプチド HDA-43 の合成法を簡単に述べる。

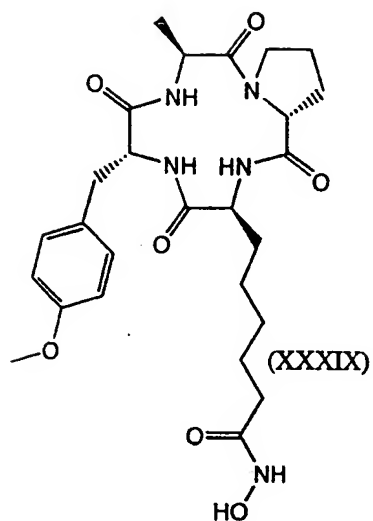
Boc-L-Aaz(Obzl)-OxR を出発原料とし、HDA-38; cyclo(-L-Asu(NHOH)-D-Phe-L-Phe-L-Pro-)の実施例 14 に準じ、環化反応、側鎖カルボン酸のヒドロキサム酸構造への変換を行い、標記環状テトラペプチド HDA-43 を得た。

HPLC:  $R_t = 18.92$  min (column: WakoPak C18, 4.6 x 150 mm, 10-100% linear gradient  $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$  TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml/min)

FAB-MS:  $m/z = 588$  ( $M + H$ )<sup>+</sup>

(実施例 31) HDA-44; cyclo(-L-Asu(NHOH)-D-Tyr(Me)-L-Ala-D-Pro-)

下記式 (XXXIX) :



で示される標記環状テトラペプチド HDA-44 の合成法を簡単に述べる。

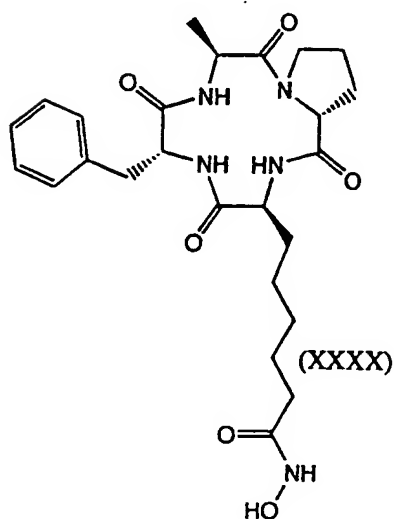
Boc-L-Asu(OBzl)-OxR を出発原料とし、HDA-38; cyclo(-L-Asu(NHOH)-D-Phe-L-Phe-L-Pro-)の実施例 14 に準じ、環化反応、側鎖カルボン酸のヒドロキサム酸構造への変換を行い、標記環状テトラペプチド HDA-44 を得た。

HPLC: Rt = 12.89 min (column: WakoPak C18, 4.6 x 150 mm, 10-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml/min)

FAB-MS: m/z = 532 (M + H)<sup>+</sup>

(実施例 32) HDA-45; cyclo(-L-Asu(NHOH)-D-Phe-L-Ala-D-Pro-)

下記式 (XXXX) :



で示される標記環状テトラペプチド HDA-45 の合成法を簡単に述べる。

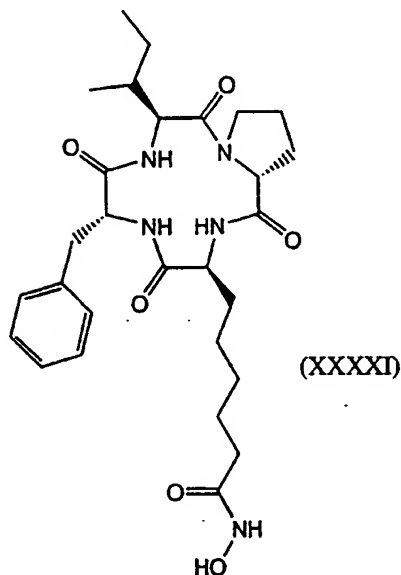
Boc-L-Asu(OBzl)-OxR を出発原料とし、HDA-38; cyclo(-L-Asu(NHOH)-D-Phe-L-Phe-L-Pro-)の実施例 14 に準じ、環化反応、側鎖カルボン酸のヒドロキサム酸構造への変換を行い、標記環状テトラペプチド HDA-45 を得た。

HPLC: Rt = 12.91 min (column: WakoPak C18, 4.6 x 150 mm, 10-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml/min)

FAB-MS: m/z = 544 (M + H)<sup>+</sup>

(実施例 33) HDA-46; cyclo(-L-Asu(NHOH)-D-Phe-L-Ile-D-Pro-)

下記式 (XXXXI) :



で示される標記環状テトラペプチド HDA-46 の合成法を簡単に述べる。

Boc-L-Asu(OBzl)-OxR を出発原料とし、HDA-38; cyclo(-L-Asu(NHOH)-D-Phe-L-Phe-L-Pro-)の実施例 14 に準じ、環化反応、側鎖カルボン酸のヒドロキサム酸構造への変換を行い、標記環状テトラペプチド HDA-46 を得た。

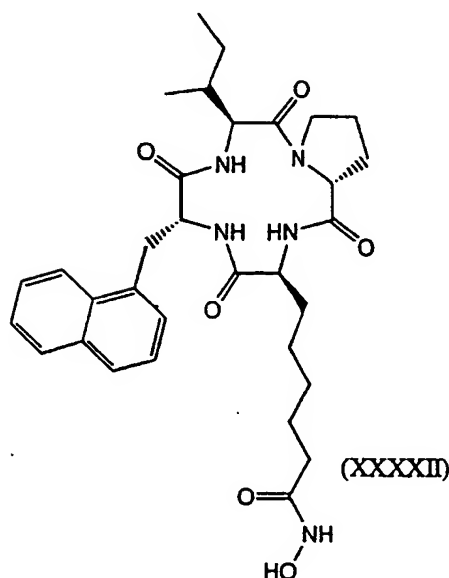
HPLC: Rt = 18.46 min (column: WakoPak C18, 4.6 x 150 mm, 10-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml/min)

FAB-MS: m/z = 502 (M + H)<sup>+</sup>



(実施例 3 4) HDA-47 ; cyclo(-L-Asu(NHOH)-D-Naf-L-Ile-D-Pro-)の合成 (D-Naf: D-1-naphthylalanine)

下記式 (XXXXII) :



で示される標記環状テトラペプチド HDA-47 の合成法を簡単に述べる。

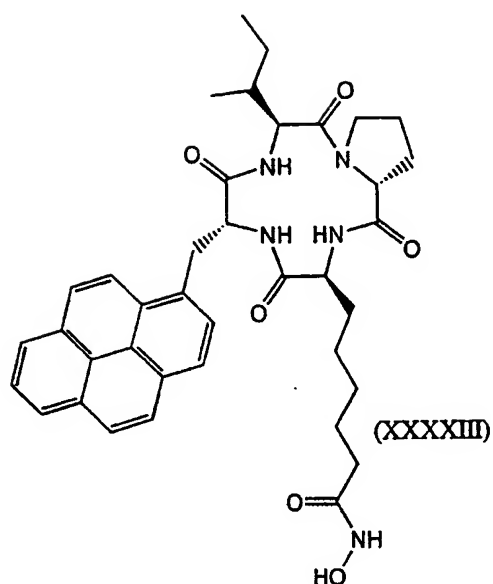
Boc-L-Asu(OBzl)-OxR を出発原料とし、HDA-38; cyclo(-L-Asu(NHOH)-D-Phe-L-Phe-L-Pro-)の実施例 1 4 に準じ、環化反応、側鎖カルボン酸のヒドロキサム酸構造への変換を行い、標記環状テトラペプチド HDA-47 を得た。

HPLC: Rt = 20.52 min (column: WakoPak C18, 4.6 x 150 mm, 10-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml/min)

FAB-MS: m/z = 594 (M + H)<sup>+</sup>

(実施例 3 5) HDA-48 ; cyclo(-L-Asu(NHOH)-D-Pya-L-Ile-D-Pro-)の合成 (D-Pya: D-1-pyrenylalanine)

下記式 (XXXXIII) :



で示される標記環状テトラペプチド HDA-48 の合成法を簡単に述べる。

Boc-L-Asu(OBzl)-OxR を出発原料とし、HDA-38; cyclo(-L-Asu(NHOH)-D-Phe-L-Phe-L-Pro-)の実施例 14 に準じ、環化反応、側鎖カルボン酸のヒドロキサム酸構造への変換を行い、標記環状テトラペプチドに HDA-48 を得た。

HPLC: Rt = 23.56 min (column: WakoPak C18, 4.6 x 150 mm, 10-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA over 30 min, flow rate 1.0 ml/min)

FAB-MS: m/z = 667.81 (M + H)<sup>+</sup>

#### (試験例 1) MHC class-I 分子発現促進活性

本発明の環状テトラペプチド誘導体の有する MHC class-I 分子発現促進作用を以下の試験により検証した。即ち、本試験において、癌細胞を用いて、本発明の環状テトラペプチド誘導体を作用させることで、MHC class-I 分子発現が促進されることを検証した。

#### 試験法

用いた癌細胞は、米国国立癌研究所より分譲を受けたマウスメラノーマ細胞である B16/BL6 細胞を使用した。該細胞の培養は、10% FBS を添加した MEM 培地を用い、37℃、5%二酸化炭素存在下、水蒸気飽和したインキュベーターを用いて行

った。

被験化合物は、予めジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、濃度 100 mM 又は 10 mM の原溶液に調製した。また、ヒストンデアセチラーゼ酵素阻害活性を有することが判明しているトリコスタチン A 市販品（和光純薬より購入）を、同じく DMSO に溶解し、濃度 5 mg/ml (16.54 mM) の原溶液に調製した。トリコスタチン A は、ヒストンデアセチラーゼ酵素阻害活性に起因する MHC class-I 分子発現促進作用の陽性対照化合物とした。なお、被験化合物原溶液の溶媒として用いる DMSO は、本試験において不可避免的に培地中へ混入することになるが、試験に用いられる混入量の範囲では、試験結果に影響を及ぼさないことは別途確認した。

前記の B16/BL6 細胞を 5000 個/well の細胞密度で 96 穴マイクロプレートに播種し、各 well 当たり上記の培地 200  $\mu$ l 中で、24 時間培養した後、被験化合物の原溶液所定量を培地に希釈した液 10  $\mu$ l を添加し、引き続き 72 時間培養した。その後、各 well を PBS（リン酸緩衝液）で一回洗浄し、浮遊する細胞及び培地を除いた後、0.1% グルタルアルデヒド溶液で 3 分間処理し、細胞の固定を行った。

固定した細胞表面に発現している MHC class-I 分子の量は、以下の方法で測定した。一次抗体として、マウスの MHC class-I 分子に対する抗体である抗 H-2K<sup>b</sup>D<sup>d</sup> 抗体（市販品；明治乳業）を用い、二次抗体として、ビオチン化抗マウス IgG+M（市販品；ケミコン社）を用い、次いで、標識酵素として、ストレプトアビジン- $\beta$ -ガラクトシダーゼコンジュゲート（市販品；BRL 社）を反応させた。上記の方法で標識された酵素  $\beta$ -ガラクトシダーゼ量を、基質として、4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactoside（市販品：販売元ナカライテック）を用い、酵素反応の生成物に起因する蛍光強度（励起：365nm、蛍光：450nm）をマイクロプレートリーダーで測定した。なお、被験化合物の添加量を零とした別の well に対して、前記の一次抗体を添加せずに、それ以降は同じ操作を施し、この別の well において測定される蛍光強度をバックグラウンドの水準とした。実際に測定される値（バックグラウンドを含んだ見掛けの値）から、前記のバックグラウンドの

水準を差し引いた値を、発現している MHC class-I 分子量を反映する真の測定値とした。

なお、被験化合物の添加量を零とした群を参照群とし、この群において発現している MHC class-I 分子量の測定値を基準値とした。各被験化合物の添加濃度における、発現している MHC class-I 分子量は、前記の基準値を 1 とする相対値で表す。各被験化合物に関して、添加濃度を種々に選び、MHC class-I 分子発現促進作用の添加濃度依存性を調べた。

本発明の環状テトラペプチド誘導体ならびに陽性対照のトリコスタチン A に対する評価結果の一例を図 3 と図 4 に示す。図 3 には、参考として、上記参考例 1 の化合物に対する評価結果も併せて示す。加えて、参考化合物として、ニコチン酸 (nicotinic acid)、ニコチン酸アミド (nicotinamide)、ニコチン酸ヒドロキシサム酸 (nicotinic acid hydroxamate) の三種の化合物についても、同様の評価を行い、その結果を図 5 に示す。

図 3 並びに図 4 に示すとおり、実施例 1 の化合物 (HDA-5) ; cyclo(-Asu(NHOH)-Phe-Phe-D-Pro-)、実施例 2 の化合物 (HDA-17) ; cyclo(-Aaz(NHOH)-Phe-Phe-D-Pro-)、実施例 3 の化合物 (HDA-18) ; cyclo(-Api(NHOH)-Phe-Phe-D-Pro-)、実施例 4 の化合物 (HDA-12) ; cyclo(-Asu(NHOH)-D-Phe-Leu-Pip-)、実施例 5 の化合物 (HDA-15) ; cyclo(-Asu(NHOH)-Aib-Phe-D-Pro-)は何れも MHC class-I 分子発現促進作用を示すことが確認された。同じく、陽性対照のトリコスタチン A においても、図 4 に示すとおり MHC class-I 分子発現促進作用が追認された。特に、実施例 4 の化合物は、トリコスタチン A と同じ程度に低い添加濃度より、MHC class-I 分子発現促進作用を示すことが確認された。一方、参考例 1 の化合物 ; cyclo(-Asu(NHOH)-Phe-Phe-D-Pro-)<sub>2</sub> では、高い添加濃度において MHC class-I 分子発現促進作用が僅かに観測されるのみであった。即ち、参考例 1 の化合物は、実施例 1 の化合物と同じ構成単位を持つ環状オクタペプチド誘導体であるが、環状テトラペプチド誘導体である実施例 1 の化合物とは比較にならない程 MHC class-I 分子発現促進作用は低いものとなっている。換言

するならば、末端にヒドロキサム酸構造（ヒドロキシアミノカルボニル構造）を有する側鎖が重要であることは勿論であるが、それに加えて、環状テトラペプチド構造部分がMHC class-I分子発現促進作用に重大なる寄与を持つことが結論される。なお、上述した MHC class-I 分子発現促進作用の添加濃度依存性の評価結果を基に、無添加を基準として、MHC class-I 分子発現量が2倍となる添加濃度  $C_{x2}$  を求めた。その結果の一例を、表1に示す。

表1

被験化合物	2倍促進濃度 $C_{x2}$
実施例1の化合物 (HDA-5)	135 nM
実施例2の化合物 (HDA-17)	1120 nM
実施例3の化合物 (HDA-18)	11600 nM
実施例4の化合物 (HDA-12)	3.86 nM
実施例5の化合物 (HDA-15)	36.2 nM
参考例1の化合物 (HDA-19)	>40000 nM
トリコスタチン A	3.35 nM

ちなみに、図5に示す、ニコチン酸とその誘導体の結果を検討するならば、ヒドロキサム酸構造（ヒドロキシアミノカルボニル構造）を有するものでは、MHC class-I 分子発現促進作用が見られており、末端にヒドロキサム酸構造（ヒドロキシアミノカルボニル構造）を有する側鎖は、本発明の環状テトラペプチド誘導体におけるMHC class-I 分子発現促進作用の根幹であることの極めて有力な傍証を与えている。

なお、実施例1～3の化合物間の対比により、該末端にヒドロキサム酸構造（ヒドロキシアミノカルボニル構造）を有する側鎖のメチレン鎖長は、5が最適と判断され、トラボキシン類縁体の対応する結果であった。このメチレン鎖長の差違によるMHC class-I 分子発現促進作用の違いは、恐らく、本発明の環状テトラペプチド誘導体がヒストンデアセチラーゼに作用する際、該酵素上の環状テトラペプチド部が結合する部位と酵素活性点間の隔たりに対応して、最適なメチレン鎖長が存在していると推定される。加えて、基質のN-アセチル化されたリジンの

側鎖との対比より、酵素活性点におけるカルボニル基酸素原子の配向が、このメチレン鎖長の違い、より具体的には、奇数個か偶数個かの違いに伴い反転することも、関与すると推察される。従って、比較的柔軟性に富む飽和の炭化水素鎖より、トリコスタチン類の如く、不飽和の炭化水素鎖であるものでは、このカルボニル基酸素原子の配向が好ましい向きに保持されるため、環状テトラペプチド部の寄与の違いを補っているとも考えられる。更には、環状テトラペプチド部の寄与が若干劣るものであっても、トリコスタチン類に類した不飽和の炭化水素鎖を有するものでは、総合的には優れた MHC class-I 分子発現促進作用を発揮すると推断される。

また、図 5 に示すニコチン酸ヒドロキサム酸の添加濃度依存性と同じく、本発明の環状テトラペプチド誘導体の示す MHC class-I 分子発現促進活性は、高い濃度域において、見かけ上活性の濃度依存的上昇に抑制傾向が見られる。この現象は、ヒストンデアセチラーゼに対する阻害活性に由来する細胞増殖の抑制が起こりはじめ、結果的に MHC class-I 分子発現量総和の上昇が抑制されている結果と解釈される。即ち、ヒストンデアセチラーゼに対する阻害活性に由来する細胞増殖の抑制作用が高濃度域において、顕著に見出されている。

加えて、本発明の環状テトラペプチド化合物に関して、その他の実施例において調製される化合物についても、MHC class-I 分子発現促進活性を評価した。複数回のアッセイを実施し、二倍発現促進濃度についてまとめたものを表 2 に示す。この表 2 には、既に表 1 に示す、HDA-5, 17, 18, 12, 15, 19, 及びトリコスタチン A の値も再掲されている。

表 2

compounds	conc. for 2-fold expression (nM)		
	mean	SD	N
trichostatin A	2.81	1.95	14
trichostatinC	6.88	0.00	1
trapoxin A	3.59	0.00	1
cyclo(-Aaz(NHOH)-Phe-Phe-D-Pro-) (CHAP17)	990	168	3
cyclo(-Api(NHOH)-Phe-Phe-D-Pro-) (CHAP18)	10900	890	3
cyclo(-Asu(NHOH)-Phe-Phe-D-Pro-) (CHAP5)	98.2	23.3	11
cyclo(-Asu(NHOH)-D-Phe-Phe-D-Pro-) (CHAP27)	3.01	1.26	7
cyclo(-Asu(NHOH)-D-Phe-Phe-Pro-) (CHAP38)	558	97	4
cyclo(-Asu(NHOH)-Phe-D-Phe-Pro-) (CHAP39)	65800	6050	3
cyclo(-Asu(NHOH)-Phe-Phe-Sar-) (CHAP40)	748	337	7
cyclo(-Asu(NHOH)-D-Phe-Phe-Sar-) (CHAP41)	24.5	15.6	3
cyclo(-Asu(NHOH)-D-Phe-Ala-D-Pro-) (CHAP45)	23.1	3.5	3
cyclo(-Asu(NHOH)-D-Pro-Phe-D-Phe-) (CHAP37)	320	52	4
cyclo(-Asu(NHOH)-Phe-Phe-D-Pro-)2 (CHAP19)	weak		3
cyclo(-Asu(NHOH)-D-Phe-Ile-D-Pro-) (CHAP46)	1.96	0.53	3
cyclo(-Asu(NHOH)-D-Naf-Ile-D-Pro-) (CHAP47)	9.59	12.17	9
cyclo(-Asu(NHOH)-D-Pya-Ile-D-Pro-) (CHAP48)	0.846	0.956	4
cyclo(-Lys(Ac)-Phe-Phe-D-Pro-) (CHAP5-Ac)	240000	0	1
cyclo(-Lys(Ac)-Phe-Phe-D-Pro-)2 (CHAP5-Ac)2	75000	0	1
cyclo(-Lys(BrAc)-Phe-Phe-D-Pro-) (CHAP5-BrAc)	5660	0	1
cyclo(-Asu(NHOH)-D-Tyr(Me)-Ile-Pro-) (CHAP30)	16.9	8.2	4
cyclo(-Asu(NHOH)-D-Tyr(Me)-Ile-D-Pro-) (CHAP31)	1.41	0.51	6
cyclo(-Api(NHOH)-D-Tyr(Me)-Ile-D-Pro-) (CHAP42)	512	247	5
cyclo(-Aaz(NHOH)-D-Tyr(Me)-Ile-D-Pro-) (CHAP43)	155	66	5
cyclo(-Asu(NHOH)-D-Tyr(Me)-Ile-Pip-) (CHAP49)	5.30	2.16	9
cyclo(-Asu(NHOH)-D-Tyr(Me)-Ile-D-Pip-) (CHAP50)	0.203	0.099	7
cyclo(-Asu(NHOH)-D-Tyr(Me)-Ile-Tic-) (CHAP51)	10.97	3.05	6
cyclo(-Asu(NHOH)-D-Tyr(Me)-Ile-D-Tic-) (CHAP52)	0.191	0.103	4
cyclo(-Asu(NHOH)-D-Tyr(Me)-Ala-D-Pro-) (CHAP44)	35.00	4.80	3
cyclo(-Asu(NHOH)-D-Tyr(Me)-Ile-Pro-)2 (CHAP14)	>10000		1
cyclo(-Asu(NHOH)-D-Phe-Leu-Pro-) (CHAP28)	80.2	19.6	4
cyclo(-Asu(NHOH)-D-Phe-Leu-D-Pro-) (CHAP29)	5.41	1.72	4
cyclo(-Asu(NHOH)-D-Phe-Leu-D-Pip-) (CHAP12)	2.75	1.44	5
cyclo(-Asu(NHOH)-D-Phe-Leu-Pip-) (CHAP53)	19.8	4.1	3
cyclo(-Asu(NHOH)-Lys(Boc)-Phe-D-Pro-) (CHAP32)	773	244	2
cyclo(-Asu(NHOH)-Trp-Leu-D-Pip-) (CHAP33)	weak		2
cyclo(-Asu(NHOH)-D-Pro-Ala-D-Ala-) (CHAP13)	406	86	3
cyclo(-Asu(NHOH)-Aib-Phe-D-Pro-) (CHAP15)	33.2	8.7	3
cyclo(-Asu(NHOH)-Trp(CHO)-Leu-D-Pip-) (CHAP16)	toxic		2
Ac-Asu(NHOH)-NH-Bzl	2410	771	3
Ph-(CH2)5-CONHOH	11400	0	1
nicotinic acid hydroxamate	28000	0	2
benzohydroxamic acid	35800	2480	2
benzoic acid	>200000		1
nicotinamide	>1000000		1
nicotinic acid	>1000000		1

この表2の結果を参照すると、本発明の環状テトラペプチドを構成する4種のアミノ酸残基について、その立体配置に関する上述する好適な選択は、立体配置のみが異なる立体異性体間の比較により、検証される。一例を挙げると、環状テトラペプチドを特徴付ける側鎖にヒドロキサム酸構造を有するAsu(NHOH)がL-体であるHDA-5の立体配置を、Asu(NHOH)を基準として最初にLと記しLLLDと記載すると、HDA-5と構成アミノ酸の種類は同じであるが、その立体配置の組み合わせが異なる異性体であるHDA-27, 38, 39はそれぞれ、LDLD, LDLL, LLDLと記載される。この4種の立体異性体HDA-5, 27, 38, 39それぞれの二倍促進濃度は98.2, 3.01, 558, 及び65800 nMであり、MHC class-I分子発現促進活性強度の序列としては、LDLD > LLLD > LDLL > LLDLとなっている。即ち、環状テトラペプチドを構成するアミノ酸残基のうち、Asu(NHOH)にL-体を選択する際、Asu(NHOH)に隣接する環状アミノ酸残基に、D-体を選択するのが好ましく、加えて、Asu(NHOH)に隣接する他方のアミノ酸残基も、D-体を選択する更に好ましい結果となっている。同じく、HDA-30 (LDLL)とHDA-31 (LDLD)の比較、HDA-28 (LDLL)とHDA-29 (LDLD)の比較、HDA-53 (LDLL)とHDA-12 (LDLD)の比較、HDA-40 (LDLL)とHDA-50 (LDLD)の比較、及びHDA-51 (LDLL)とHDA-52 (LDLD)の比較においても、側鎖にヒドロキサム酸構造を有するアミノ酸残基に隣接する環状アミノ酸残基に、D-体を選択するのが好ましく、加えて、隣接する他方のアミノ酸残基も、D-体を選択すると更に好ましい結果となっている。

なお、試験例4に示す、ヒストンデアセチラーゼ (histone deacetylase) 阻害活性の評価結果においても、HDA-27 (LDLD) > HDA-5 (LLLD), HDA-31 (LDLD) > HDA-30 (LLLD), HDA-29 (LDLD) > HDA-28 (LLLD)という阻害活性の序列が同様に検証されている。但し、ヒストンデアセチラーゼ阻害活性における差異は、MHC class-I分子発現促進活性における差異ほど顕著ではない。

MHC class-I分子発現促進作用を発揮するためには、環状テトラペプチドは細胞外より、細胞内に移行する過程も係わる。あるいは、アセチル化ヒストン中に含まれる特定のリジンにおけるアセチル化の保持がより重要であることも想定さ



れる。即ち、細胞内への輸送過程など、ヒストンデアセチラーゼ阻害活性以外の要因の影響が、前記の差異を引き起こすものと推察される。

しかしながら、これらの比較より、特に、細胞自体に作用させる際には、ヒストンデアセチラーゼ阻害活性を示す天然の環状テトラペプチドに見出される立体配置の組み合わせである、LLLD や LDLL よりも、LDLD 型の方がより優れていると判断される。

#### (試験例2) ヒストン脱アセチル化に対する阻害効果

本発明の環状テトラペプチド誘導体の有する MHC class-I 分子発現促進作用が、ヒストン脱アセチル化に対する阻害効果に付随することを検証するため、上記の B16/BL6 細胞内におけるヒストン脱アセチル化を阻害する効果の確認を行った。

#### 試験法

7.5 ml 容の培養用フラスコに、B16/BL6 細胞  $1.5 \times 10^5$  個を播き、予め4日間培養した。次いで、被験化合物の所定量を添加して、引き続き6時間培養した。その後、0.25%トリプシン酵素液を用いて、細胞を剥がし、PBS で一回洗浄後、 $-80^{\circ}\text{C}$  で一時保存した。

この細胞試料から常法に従い、ヒストンをクロマチンより分離し、他の蛋白質とともに採取した。得られた蛋白質試料を  $1\mu\text{g}/\text{lane}$  の量にて、AUTgel 電気泳動に掛けた。該ゲルに銀染色を施し、泳動により分離されたバンドを検出した。

一例として、上記実施例1の化合物を  $10\mu\text{M}$  添加した結果と、トリコスタチン A を  $1\mu\text{M}$  添加した結果、 $\text{INF-}\gamma$  を  $100\text{U}/\text{ml}$  添加した結果とを比較したものを図6に示す。なお、参照群として、被験化合物の添加量を零としたものの結果も併せて示す。図6において、最下端の部分にヒストン H4 のバンドが見られるが、トリコスタチン A と実施例1の化合物を添加した結果では、この領域に明確に合計5本のバンドが分離されている。無添加の参照例と対比させると、前記の5本のバンド中の3本は参照例では見いだせず、これらは、脱アセチル化の程度が異なる N-アセチル化されたヒストンであることが判る。

即ち、デアセチラーゼ酵素阻害活性を有するトリコスタチン A と同様に、実施例 1 の化合物を添加することで、ヒストンの脱アセチル化が阻害を受け、高アセチル化のヒストンが残留していることが判明した。本発明の環状テトラペプチド誘導体の添加は、ヒストン脱アセチル化に対する阻害効果を持ち、MHC class-I 分子発現促進作用は、その効果に付随するものであることが確認された。

### (試験例 3) 細胞増殖に対する抑制効果

本発明の環状テトラペプチド誘導体の有する癌化細胞における細胞増殖を抑制する作用を検証するため、上記の B16/BL6 細胞の細胞増殖に及ぼす作用を調べた。なお、細胞増殖率の評価は、市販の測定キット、具体的には、Promega 社製の商品名 CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Proliferation Assay Kit を利用した。該測定キットは、動物生細胞により、試薬の tetrazolium 化合物 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt ; MTS) が還元されて生成する生成物量を、その生成物の発色を分光学的に検出して求めるもので、前記の生成物量は生細胞量に比例するので、生細胞量の評価に利用される。

### 試験法

試験例 1 と同じ手順で B16/BL6 細胞を 96 穴マイクロプレートに播種し、24 時間培養した後、各穴当たり被験化合物の原溶液所定量を培地に希釈した液 10  $\mu$ l を添加する。その後、更に 48 時間培養を続けた後、上記の CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Proliferation Assay Kit の試薬液 20  $\mu$ l を加える。37℃で 1 時間インキュベーションを続けた後、発色量を 490nm における吸光度として、マイクロプレートリーダーを用いて測定する。

なお、被験化合物の添加量を零とした群を参照群として、参照群における細胞増殖量を基準 (100%) として、被験化合物を添加した群の細胞増殖量は相対値で表す。各被験化合物について、種々の添加濃度における細胞増殖量を測定し、細胞増殖量の添加濃度依存性を調べ、その結果から無添加の参照群における細胞増

殖量の50%に細胞増殖量が抑制される添加濃度を求めた。

前記 B16/BL6 細胞の細胞増殖に対する50%抑制濃度の評価結果の一例を表3に示す。なお、表3には、癌細胞に対して細胞増殖抑制作用を示すことが報告されている陽性対象として、トリコスタチンAの評価結果も併せて示す。

表3

被験化合物	50%抑制濃度
実施例1の化合物 (HDA-5)	210 nM
実施例4の化合物 (HDA-12)	12.3 nM
実施例5の化合物 (HDA-15)	92.5 nM
トリコスタチンA	14.3 nM

本発明の環状ペプチド誘導体は、表3に示すとおり、表1に例示するMHC class-I 分子発現促進が達成される濃度より高い濃度域において、それぞれ細胞増殖抑制作用を示すことが分かる。なお、実施例4の化合物は、トリコスタチンAより低い濃度より細胞増殖抑制作用を示しており、その影響のため、上述したMHC class-I 分子発現促進作用の評価結果においては、見かけの促進量の頭打ち傾向が見られている。

加えて、本発明の環状ペプチド誘導体の有する癌化細胞における細胞増殖を抑制する作用は、上記の試験例で用いたB16/BL6細胞株のみでなく、その他の癌化細胞における細胞増殖をも抑制することを検証した。試験方法は、上述の手順に従ったものであるが、但し、薬物添加後のインキュベーション時間は72時間で行った。

具体例として、癌細胞として、マウス悪性黒色腫細胞であるB16/BL6細胞株及びB16細胞株、白血病細胞であるL1210細胞株、大腸癌細胞であるColon26細胞株、及び肝癌細胞であるMH134細胞株を用いた評価結果を示す。これら各種の癌

細胞に対して、各被験化合物の示す細胞増殖抑制作用について、50%増殖抑制濃度を表4に示す。また、トリコスタチンAについての結果も併せて、表4に示す。

表4

compounds	L1210 (nM)		B16/BL6 (nM)		B16 (nM)		Colon 26 (nM)		MH134 (nM)	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
HDA-17	7380	1160	1260	210	23500	5000	29300	23900	19900	8410
HDA-18	>100000		59300	17300	>100000		>100000		>100000	
HDA-13	2770	950	866	203	15400	4700	11000	1600	7920	2300
HDA-5	500	96	257	35	3370	1030	2160	280	1660	763
HDA-28	1330	1371	470	54	3820	1660	7370	1090	4830	2050
HDA-30	408	255	112	3	861	282	1570	270	1510	106
HDA-15	193	122	110	1	1230	630	908	144	946	262
HDA-27	53.0	21.7	18.0	2.5	309	95	277	62	236	59
HAD-31	18.8	5.4	5.43	0.39	44.2	22.3	33.0	12.0	50.7	8.9
HDA-29	43.8	19.9	15.8	5.6	293	109	198	51	176	87
HDA-12	28.3	13.6	9.44	3.11	262	174	149	39	112	48
TSA	12.4	2.4	19.1	10.5	621	50	139	42	41.7	23.6

ここに比較する範囲においても、細胞増殖に対する抑制効果と MHC class-I 分子発現促進作用に関して、各化合物の活性の序列は一致が見出される。なお、細胞増殖に対する抑制効果において、その感受性は癌細胞種によって大きく異なる化合物があり、必ずしも定量的にも、MHC class-I 分子発現促進作用と一致するものではないことが分かった。この例で比較されている本発明の環状テトラペプチドにおいて、HDA-31 はどの癌細胞に対しても、 $IC_{50}$  値は数 nM から数 10 nM であり、他を有意に上回る増殖抑制活性を発揮している。

#### (試験例4) ヒストンデアセチラーゼ酵素阻害活性

上述した試験例2における細胞系におけるヒストン脱アセチル化に対する阻害効果が、実際に本発明の環状テトラペプチド化合物によるヒストンデアセチラーゼの酵素活性を阻害によることの査証を得る目的で、本発明の環状テトラペプチド化合物が、in vitro の系において、ヒストンデアセチラーゼの酵素活性を阻害することを以下の評価により検証した。

#### 評価方法

放射標識アセチル化ヒストンを基質として用いた酵素アッセイ系により、ヒストンデアセチラーゼ酵素阻害活性の評価を行った。基本的な条件は、吉田ら (J.

Biol. Chem. 265, 17174-17179, 1990) の方法に従った。

マウスヒストンデアセチラーゼは、FM3A 細胞から部分精製したものを使用した。細胞を HDA buffer (15 mM リン酸カリウム、5% グリセロール、0.2 mM EDTA、pH 7.5) に懸濁し、ホモジナイズした後、遠心で核を集め (35000×g, 10 min)、1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を含む同 buffer 中で再びホモジナイズした。超音波破碎し、遠心した上清の (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 濃度を 3.5 M まで上昇させデアセチラーゼ酵素蛋白質を沈殿させた。この沈殿物を HDA buffer に再溶解し、HDA buffer に対して透析後、DEAE-cellulose カラムにアプライし、NaCl の勾配で溶出した。活性画分をヒストンデアセチラーゼ酵素液として用いた。

基質として、[<sup>3</sup>H]acetyl histone を用いた。FM3A 細胞の培養液中に 5 mM の n-酪酸ナトリウム存在下、[<sup>3</sup>H]acetate を添加し 30 分インキュベートすることによりヒストンを放射ラベルした。常法によりヒストンを調製し、基質液として使用した。

アッセイは、被験化合物を所定濃度添加し、一方、無添加条件を参照群として、基質液と酵素液を 37°C で 10 分インキュベートすることにより行った (反応容積 100 μl)。酵素反応を 10 μl の濃塩酸を加えて止め、切り出された [<sup>3</sup>H]acetate を酢酸エチルで抽出して放射活性を測定した。阻害活性は、参照群における酵素活性を 50% 阻害する濃度で表した (50% 阻害濃度)。

評価結果の一例を示す表 5 にある通り、本発明の環状テトラペプチド化合物は、何れもヒストンデアセチラーゼ阻害活性を示すことが分かった。側鎖ヒドロキサム酸構造を有する化合物であり、ヒストンデアセチラーゼに対する酵素阻害は、可逆的であることも確認された。

表 5

ヒストンデアセチラーゼ阻害物質の効果

	被験化合物	IC <sub>50</sub> (nM)
	Sodium n-butyrate	119,000
	trapoxin A	0.47
	トリコスタチン A	1.44
実施例 10	HDA-6	27,800
実施例 1	HDA-5	2.18
実施例 2	HDA-17	19.8
実施例 3	HDA-18	390
実施例 20	HDA-27	1.45
実施例 19	HDA-28	6.04
実施例 22	HDA-29	1.59
実施例 23	HDA-30	4.90
実施例 21	HDA-31	2.08
実施例 9	HDA-32	4.95

試験例 1 の細胞系における MHC class-I 分子発現促進作用の評価結果と同じく、本発明の環状テトラペプチドを特徴付ける側鎖のヒドロキサム酸構造において、環構造が同じ際には、HDA-5 の如く、その側鎖のメチレン鎖長が 5 において、最適の阻害活性が得られ、鎖長炭素数 6 の HDA-17、鎖長炭素数 4 の HDA-18 はともに相当に高い阻害活性を示すものの、鎖長炭素数 5 のものより、活性は劣るものである。この一致からも、本発明の環状テトラペプチドの MHC class-I 分子発現促進作用は、ヒストンデアセチラーゼ阻害活性に起因することが結論される。

## (試験例 5)

ヒストンデアセチラーゼ酵素阻害活性 (合成ペプチド基質を用いた評価)

前記の試験例 4 においては、細胞から採取したヒストンを基質として、本発明の環状テトラペプチド化合物が示すヒストンデアセチラーゼ酵素阻害活性を評価したが、その結果を補完する目的で、合成ペプチド基質を利用して、ヒストンデアセチラーゼ酵素阻害活性の再評価を行った。

## 試験方法

ヒストンデアセチラーゼの調製は基本的には吉田ら (J. Biol. Chem. 265, 17174-17179, 1990) の方法に従って行った。酵素は B16/BL6 細胞から部分精製したものを使用した。細胞を HDA buffer (15 mM リン酸カリウム、5% グリセロール、0.2 mM EDTA、10% 2-mercaptoethanol、pH 7.5) に懸濁し、ホモジナイズした後、遠心で核を集め (2500×g, 10 min)、1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を含む同 buffer 中で再びホモジナイズした。超音波破碎し遠心して、採取した上清中の (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 濃度を 3.5 M まで上昇させ、ヒストンデアセチラーゼを沈殿させた。この沈殿物を HDA buffer に再溶解し、ゲル濾過で HDA buffer に溶媒交換し、粗ヒストンデアセチラーゼ酵素液として用いた。

基質として、合成基質ペプチド；[<sup>3</sup>H]acetylated histone H4 peptide を用いた。この [<sup>3</sup>H]acetylated histone H4 peptide は、ヒストン H4 の N 末ペプチド；SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVC (C 末にはシステインをつけてある) を合成し、3H-無水酢酸で放射アセチル化し、基質として用いた。

アッセイは被験化合物の存在下、合成基質液と酵素液を 37°C で三時間インキュベートすることにより行った (反応容積 100 μl)。反応を 25 μl の 1M HCl, 0.2 M 酢酸を添加で止め、酵素反応で切り出された [<sup>3</sup>H]acetate を酢酸エチルで抽出して放射活性を測定した。なお、参照群として、被験化合物を反応系添加せず、同じ操作を行った。阻害活性は、参照群におけるヒストンデアセチラーゼ酵素活性を 50% 阻害する濃度で表した (50% 阻害濃度)。

評価結果の一例を表 6 に示す。天然のアセチル化ヒストンを基質とした結果と、合成基質を用いた結果間で若干の不一致が見られる。しかしながら、この表 6 に示す、環状テトラペプチドは何れもヒストンデアセチラーゼ酵素阻害活性に優れることは、何れの結果においても検証される。

この結果と、細胞レベルで見いだされる MHC class-I 分子発現促進活性、細胞増殖抑制作用とを対比させると、酵素阻害活性がより高い環状テトラペプチドにおける、MHC class-I 分子発現促進活性、細胞増殖抑制作用は、それぞれ高いものの、その活性の強弱に関する序列は必ずしも酵素阻害活性の強弱の序列と一致していないことが見いだされた。

細胞内におけるヒストンデアセチラーゼ酵素阻害活性が関与する MHC class-I 分子発現促進活性、細胞増殖抑制作用においては、酵素阻害活性に加えて、当該化合物の細胞膜透過性の違い等も、本質的な影響を持つため、その影響により、MHC class-I 分子発現促進活性、細胞増殖抑制作用は必ずしも極めて高い水準に至っていない化合物もあると推断される。

表 6

化合物	IC <sub>50</sub> (nM)
トリコスタチン A	2.55
HDA-5	6.03
HDA-30	3.31
HDA-31	3.32
HDA-49	4.81
HDA-50	3.96
HDA-51	49.8
HDA-52	4.35
HDA-17	24.7
HDA-18	150
HDA-27	3.44
HDA-38	5.32
HDA-39	226
HDA-37	9.16
HDA-42	53.8
HDA-43	33.9

(試験例 6) 制癌活性の評価

本発明の環状テトラペプチド化合物は、上記の試験例 3 の結果に示す通り、in vitro での癌化細胞に対する細胞増殖抑制効果を示すことから、当然に生体内に



においても、制癌活性を有すると推断される。一方、個々の癌細胞に対する細胞増殖抑制効果の強弱が見られており、その個々の癌細胞における感受性には差異があると想定される。本発明の環状テトラペプチド化合物は、実際の生体内において、制癌活性を示すことを検証するとともに、個々の癌細胞における感受性の違いの有無を確認するため、腹水癌の系並びに固形癌の系において、代表的な癌細胞を用いて制癌活性の評価を行った。

#### (1) マウスにおける in vivo での制癌活性 (腹水癌の系)

##### 試験方法

腹水癌の系に関して、担癌マウスを用いて、本発明の環状テトラペプチド化合物の in vivo での制癌活性を評価した。用いた癌細胞は L1210, B16, Colon26, 及び MH134 である。それぞれの癌細胞を常法により培養し、PBS に懸濁して、マウス一匹当たり、L1210 は  $10^5$  個、また、B16, Colon26, 及び MH134 は  $10^6$  個をそれぞれ腹腔内に移植した ( $100 \mu\text{l}/\text{mouse}$ )。用いたマウスの種類は、L1210, B16, Colon26, MH134 についてそれぞれ CDF1, BDF1, CDF1, C3H/HeN である (7 週齢の雄性マウス)。癌細胞移植の翌日から薬物投与を開始した。L1210 については、0.5%カルボキシメチルセルロース Na 懸濁液として、また、他の癌細胞については PBS 溶液 (実際は NaOH で中和後の懸濁液として投与) として連日投与した ( $100 \mu\text{l}/\text{mouse}$ )。投与日数は、L1210 は 4 日、B16 及び MH134 は 9 日、Colon26 は 8 日である。

上記の投与期間が経過後、被験マウスを飼育し、癌細胞移植より死亡に至った日数を基に、median survival days (平均生存日数) を算定した。薬物を含まない同量の液を投与した参照群 (コントロール) の median survival days (C) と薬物投与を行った処置群の median survival days (T) の比を、パーセンテージ表示した値 (T/C%) を求めた、一例として、HDA-31 における結果を表 7 に示す。

表 7

cell lines	Median Survival days (T/C%)			
	0.015 mg/mouse	0.05 mg/mouse	0.15 mg/mouse	1.5 mg/mouse
L1210	113		125	37.5
B16	117	119	139	
Colon26	90.9	86.4	63.6	
MH134	95.8	85.4	91.7	

表7に示す結果より、癌細胞 L1210 及び B16 に対して、HDA-31 は明らかな延命効果を示した。一方、Colon26 及び MH134 においては、延命効果は確認されなかった。本発明の環状テトラペプチド化合物は、腹水癌の系においては、癌の種類により有効性は異なるものの、な抗癌剤となりうる可能性が示唆された。

## (2) マウスにおける in vivo での制癌活性 (固形癌の系)

### 試験方法

Colon26、Meth A、及び B16 の3種類のマウス癌を用いて、固形癌の系で本発明の環状テトラペプチド化合物の in vivo での制癌活性を評価した。癌細胞は定法で培養後、PBS に懸濁して  $10^5$  個をマウスの腹側部に皮内移植した。用いたマウスの種類は、Colon26、Meth A、及び B16 に対して、それぞれ CDF1、Balb/c、及び BDF1 である (7 週齢の雄性マウス)。癌移植日を day-0 とし、Colon-26 については day-4, 7, 10 の三回、Meth A 及び B16 については day-7, 10, 13, 16 の4回、被験化合物所定量を含む一定量の液を尾静脈内投与した (10, 3, 及び 1 mg/kg; 2 ml/kg)。本例では、投与液は PBS 懸濁液を用いた (NaOH で中和済み)。その後、Colon-26 については day-14 に、Meth A 及び B16 については day-21 に腫瘍径 (短径及び長径) を測定した。腫瘍重量は、 $1/2 \times \text{長径} \times \text{短径}^2$  の式を用いて、算定した値を基に推定した。抗腫瘍効果は、腫瘍重量推定値を指標とし、薬物を添加しない同量の液を投与した群を参照群とし、参照群における腫瘍重量推定値との差を抑制量として、抑制率を求めた。

一例として、HDA-31 に対する評価結果を表8に示す。

表 8

cell lines	condition	tumor weight (mg)	% inhibition
Colon 26	control	980 ± 77	
	1 mg/kg	756 ± 25	22.9
	3 mg/kg	677 ± 155	31.0
	10 mg/kg	726 ± 123	25.9
Meth A	control	3120 ± 480	
	1 mg/kg	2100 ± 570	32.5
	3 mg/kg	1230 ± 500	60.7
	10 mg/kg	1470 ± 500	52.8
B16	control	699 ± 229	
	1 mg/kg	258 ± 184	63.1
	3 mg/kg	280 ± 152	59.9
	10 mg/kg	120 ± 112	82.9

表 8 に示す結果より、これらの固形癌細胞において、HDA-31 を初めとする本発明の環状テトラペプチド化合物は有効性を示すことが確認される。特に、HDA-31 に関しては、B16 メラノーマに対して、極めて高い抑制率 80 % が得られていた。

以上の結果より、本発明の環状テトラペプチド化合物は、癌細胞の細胞増殖抑制作用を利用して、腹水癌の系ならびに固形癌の系双方において、制癌活性を示すと判断された。また、上記の例においては、薬剤を尾静脈内投与した際に制癌活性が確認されており、投与後相当の時間にわたって、血中濃度を有効濃度範囲に維持され、制癌効果が発揮されたと推断できる。

#### (試験例 7)

本発明の環状テトラペプチドは、投与後相当の時間にわたって、血中濃度を有効濃度範囲に維持されたと推断できるものの、実際に制癌剤としての応用に適合する前記の血中濃度推移が達成されることを検証した。ここにおいては、一例として、上記の試験例で使用した薬剤、HDA-31 に対する評価結果を示す。

### HDA-31 のラット血中濃度推移

#### 試験方法

ケタラル／セラクター混合麻酔下 SD ラットに HDA-31 を尾静脈内投与した (10 mg/kg; 2 ml/kg)。薬物は PBS に分散させ NaOH で中和した懸濁液を用いた。投与後一定時間おきに頸動脈より採血し (抗凝固剤としてヘパリン使用)、遠心により血漿を調製した。血漿中の HDA-31 を MTBE (methyl-t-butyl-ether) で抽出し、逆相 HPLC で分離を行い、HDA-31 に相当するピーク面積を質量分析計にて定量した。

結果を図 7 に示す。なお、図示する結果は、3 匹の平均値である。HDA-31 の癌細胞増殖抑制に関する  $IC_{50}$  値は数 nM から数 10 nM であり、100 ng/ml はモル濃度で 174 nM に相当するので、静脈内投与後数時間に亘って、前記の有効濃度を超える血中濃度が維持されていることが分かる。

また、今回の投与は微粒子の懸濁液として投与したため、微粒子状になっていた薬物は十分血中に乗らずに速やかに代謝された可能性もある。このことをも考慮すると、完全に溶解する媒体を用いればより高い血中濃度が同じ投与量で達成される可能性が想定される。また、HDA-31 よりも癌細胞増殖抑制、あるいは MHC class-I 分子発現促進に関して、上述した細胞レベルの試験結果に示す通り、例えば HDA-50, HDA-52 などにより高い活性を示す。HDA-31 よりも高い活性を示す本発明の環状テトラペプチド化合物、例えば HDA-50, HDA-52 などに関しても、ここに示した HDA-31 と類似の動態を取ると仮定したならば、これらの化合物ではもっと低用量で薬効血中濃度を達成出来ることになる。

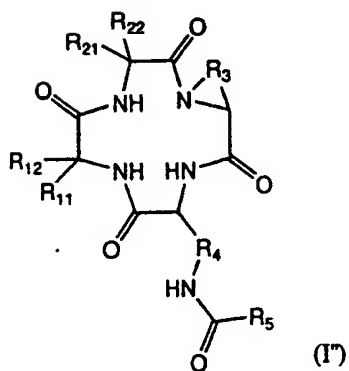
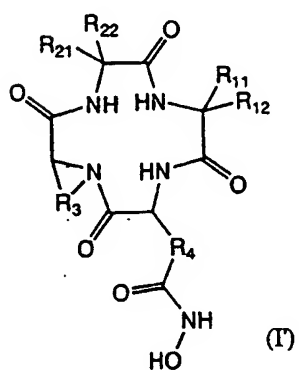
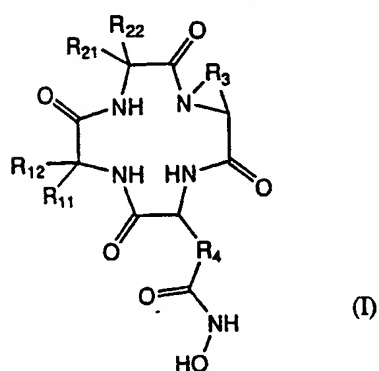
#### 産業上の利用可能性

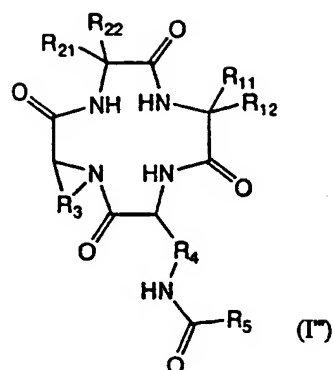
本発明の環状テトラペプチド誘導体又はその薬学的に許容される塩は、その優れたヒストンデアセチラーゼ酵素阻害活性に付随して、MHC class-I 分子発現促進に優れた活性を有する。また、ヒストンデアセチラーゼ酵素阻害に由来する細

胞増殖阻害、細胞周期の阻害作用も有しており、癌組織の拡大を抑制するので、前記の MHC class-I 分子発現促進作用を利用して、免疫系による癌細胞の排除を格段に促進することができ、抗癌剤として極めて有用である。その際、本発明の環状テトラペプチド誘導体のヒストンデアセチラーゼ酵素阻害は可逆的なものであるので、不可逆的な阻害剤と比較して、正常な組織に対しては、細胞増殖阻害、細胞周期の阻害作用などの好ましからざる副作用が格段に少ない利点を持つ。

## 請求の範囲

1. 下記的一般式 (I)、(I')、(I'') 又は (I''') のいずれかで示される環状テトラペプチド誘導体又はその薬学的に許容される塩。





(式中、

$R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{21}$ 、 $R_{22}$ は、それぞれ水素、炭素数1～6の直鎖アルキル基、炭素数3～6の分岐のアルキル基、炭素数1～5の直鎖ω-アミノアルキル基、炭素数3～5の分岐のアミノアルキル基、前記の直鎖又は分岐アミノアルキル基上のアミノ基上に炭素数3以下のアシル基又はハロゲノ置換アシル基が置換してなるN-アシル-ω-アミノアルキル基、ベンジル基、4-メトキシベンジル基、3-インドリルメチル基、(N-メトキシ-3-インドリル)メチル基、炭素数3以下のアシル基を環状窒素上に置換基として有する(N-アシル-3-インドリル)メチル基、環数4以下のアリール基が置換したメチル基から選択される一価の基を表し、 $R_3$ は、鎖上に分岐鎖を有してもよい鎖長炭素数3又は4の直鎖アルキレン基、鎖上に分岐鎖を有してもよい鎖長炭素数3又は4の直鎖アルケニレン基、鎖上に分岐鎖を有してもよい鎖長炭素数4の直鎖アルカジエニレン基、並びに、前記の直鎖アルキレン基、直鎖アルケニレン基及びアルカジエニレン基上に付加される分岐鎖が縮合環構造を形成したもの、または、これら鎖式炭化水素基を構成する炭素原子のうち、遊離原子価が存在する炭素原子以外の炭素原子の一つが酸素、イオウ又は窒素の何れかのヘテロ原子に置き換わってなる二価の基から選択される二価の基を表し、

$R_4$ は、当該鎖上に分岐鎖を有してもよい鎖長炭素数4～6の二価の鎖式炭化水素基、およびこれら鎖式炭化水素基を構成する炭素原子のうち、遊離原子価が存在する炭素原子以外の炭素原子の一つ以上が酸素、イオウ又は窒素の何れかのヘテロ原子に置き換わってなる二価の基を表し、

一般式(I'')あるいは(I''')中の $R_5$ は、メチル基またはハロゲノ置換メチル基を

表す。)

2. 前記一般式 (I) で示されることを特徴とする請求項 1 記載の環状テトラペプチド誘導体又はその薬学的に許容される塩。
3. 前記一般式 (I') で示されることを特徴とする請求項 1 記載の環状テトラペプチド誘導体又はその薬学的に許容される塩。
4. 前記一般式 (I'') で示されることを特徴とする請求項 1 記載の環状テトラペプチド誘導体又はその薬学的に許容される塩。
5. 前記一般式 (I''') で示されることを特徴とする請求項 1 記載の環状テトラペプチド誘導体又はその薬学的に許容される塩。
6. 前記請求項 1 ~ 5 の何れかに記載の環状テトラペプチド誘導体又はその薬学的に許容される塩の何れかを有効成分として含有するヒストンデアセチラーゼ阻害剤。
7. 前記請求項 1 ~ 5 の何れかに記載の環状テトラペプチド誘導体又はその薬学的に許容される塩の何れかを有効成分として含有する MHC class-I 分子発現促進剤。
8. 前記請求項 1 ~ 5 の何れかに記載の環状テトラペプチド誘導体又はその薬学的に許容される塩の何れかを有効成分として含有する医薬組成物。
9. 抗癌剤として使用される請求項 8 記載の医薬組成物。



図 1

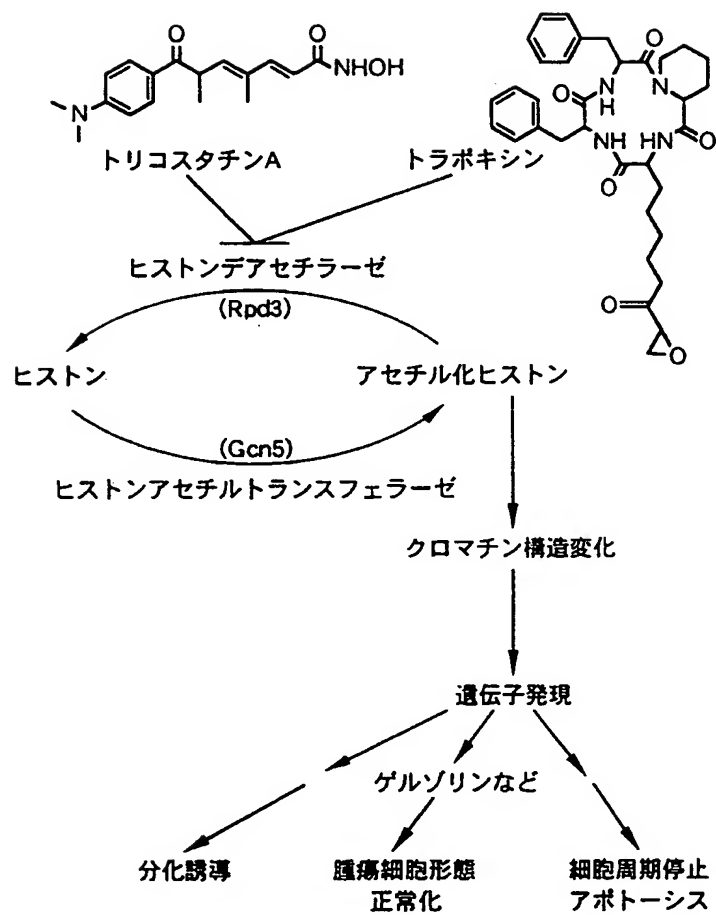
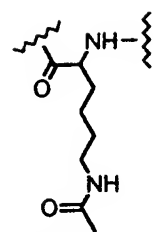
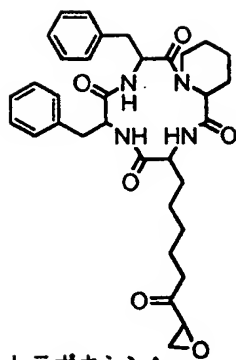


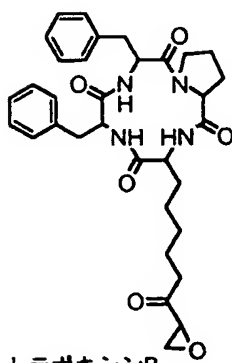
図 2



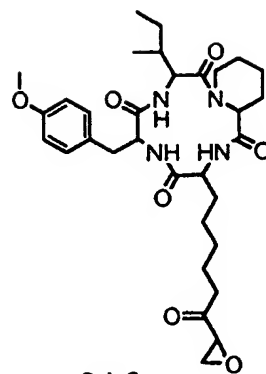
アセチル化リジン



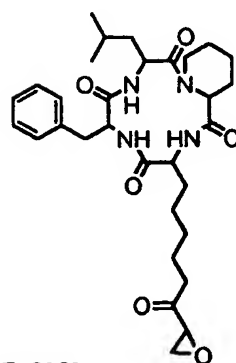
トラボキシンA



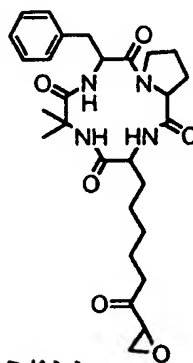
トラボキシンB



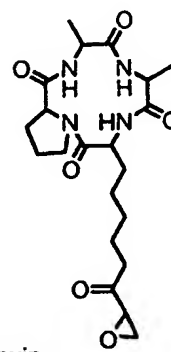
Cyt-2



WF-3161

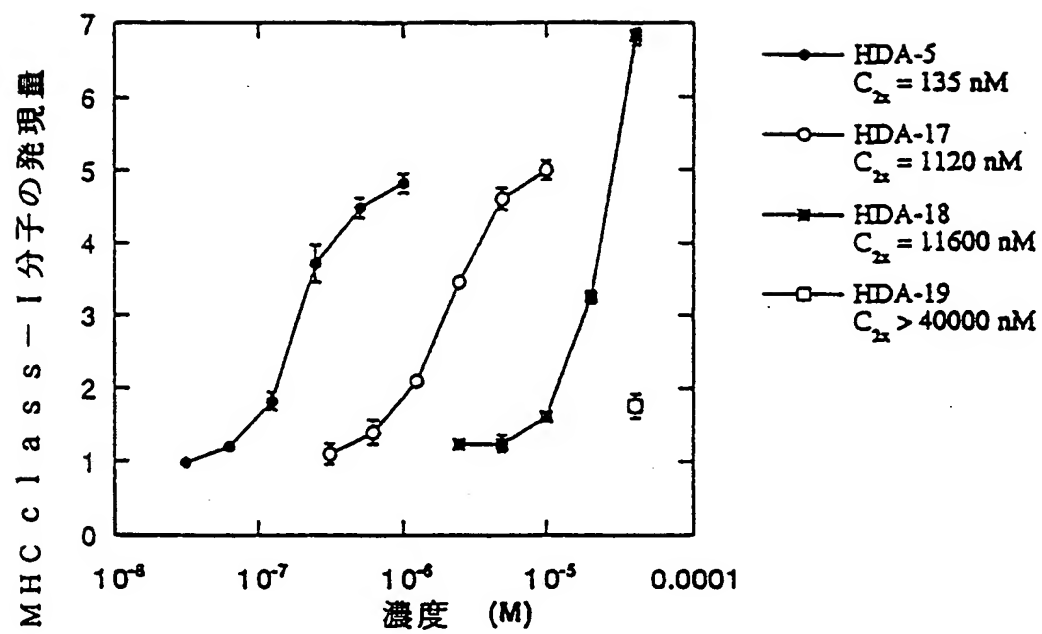


クラミドシン



HC-toxin

図 3



4

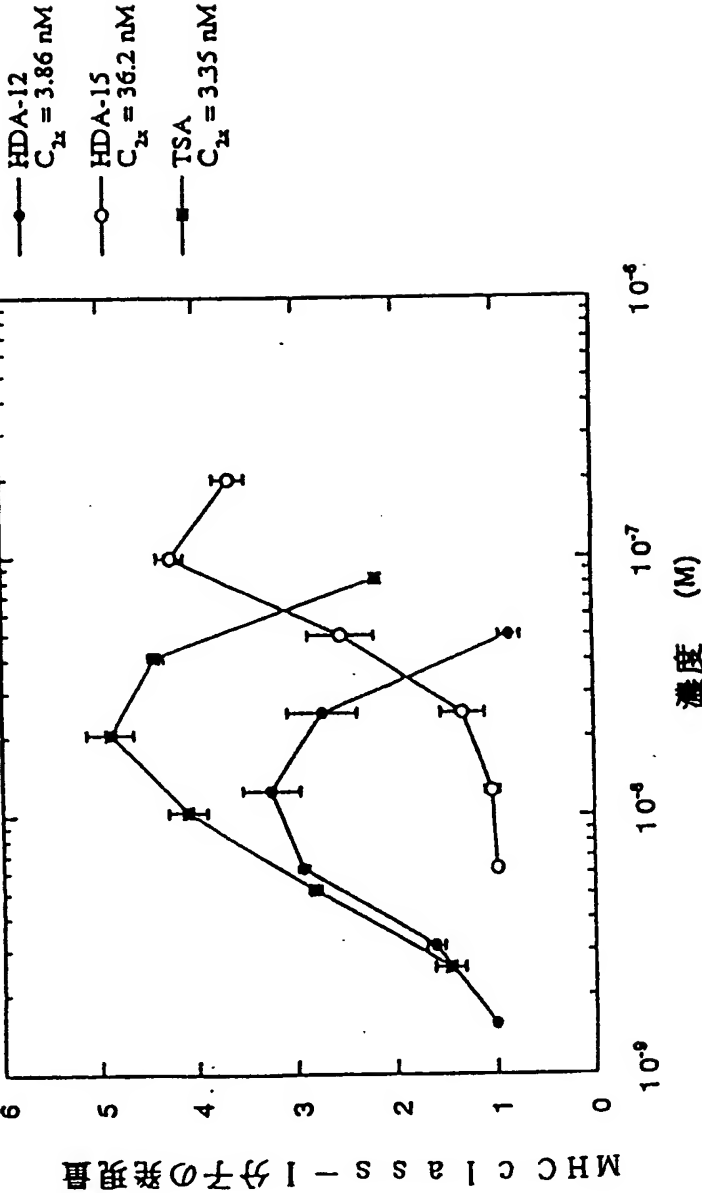
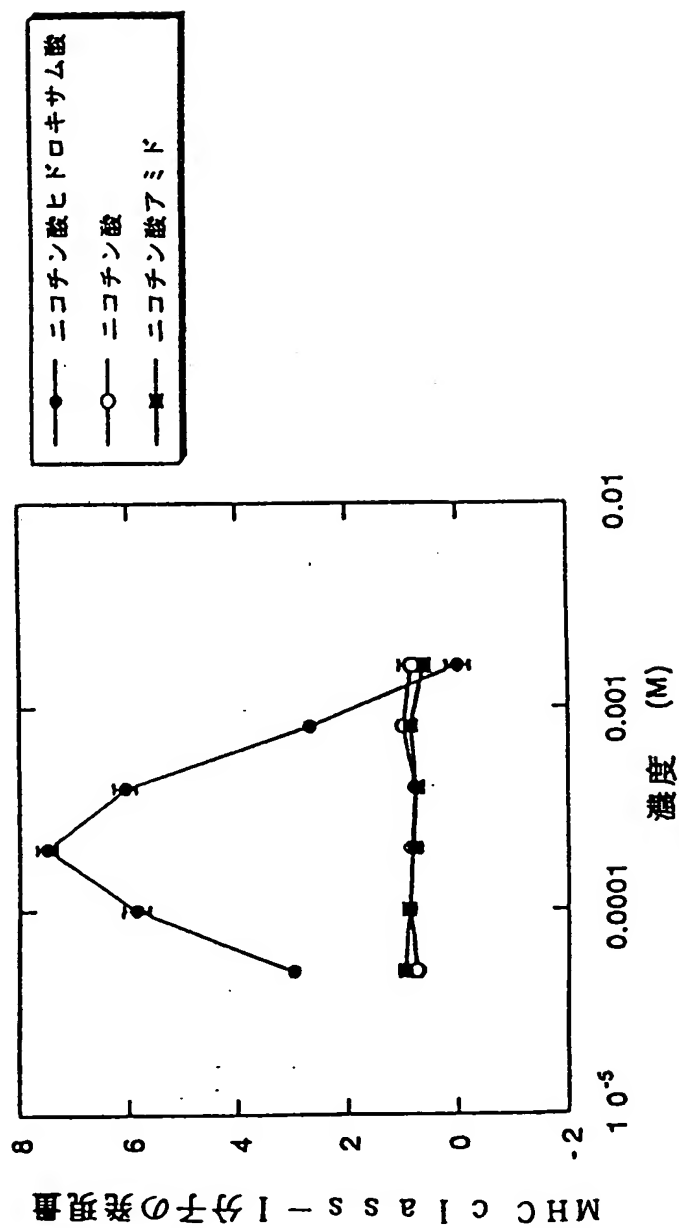


図 5



☒ 6

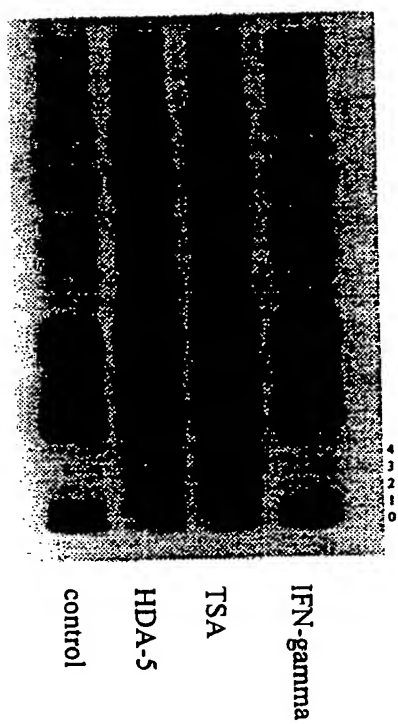
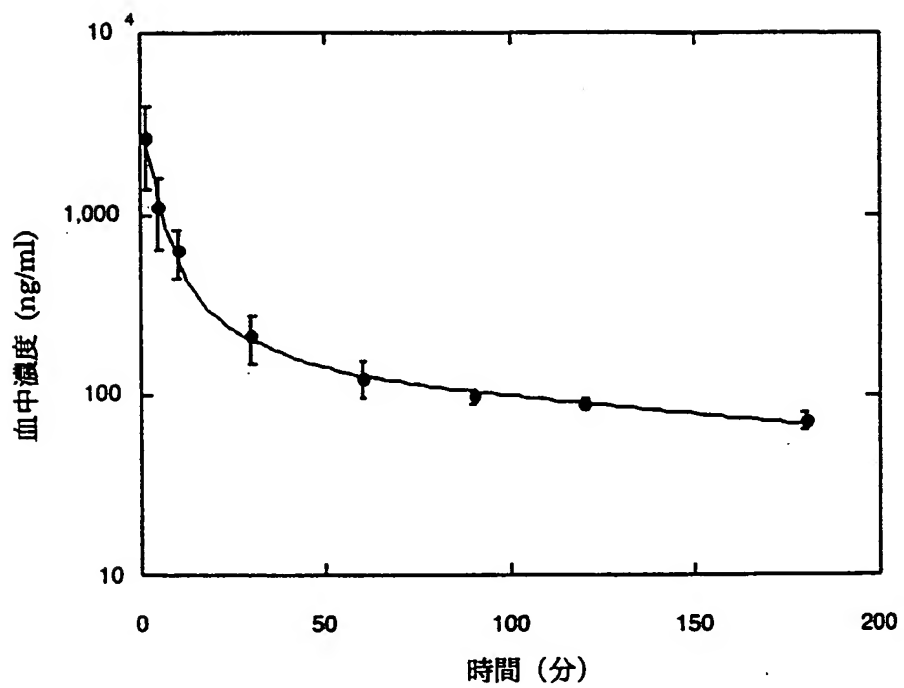


図 7



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03893

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.C1<sup>6</sup> C07K5/12, A61K38/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.C1<sup>6</sup> C07K5/12, A61K38/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), CAOLD (STN), REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KIJIMA, M. et al., "Trapoxin, an antitumor cyclic tetra-peptide, is an irreversible inhibitor of mammalian histone deacetylase.", J. Biol. Chem., Vol. 268, No. 30 (1993) p.22429-p.22435	1-9
A	BERNARDI, E. et al., "Antitumoral cyclic peptide analogs of chlamydocin.", Peptides (Pergamon) Vol. 14, No. 6 (1993) p.1091-p.1093	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
10 November, 1998 (10. 11. 98)

Date of mailing of the international search report  
17 November, 1998 (17. 11. 98)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>4</sup> C07K5/12, A61K38/12

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>4</sup> C07K5/12, A61K38/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), CAOLD (STN), REGISTRY (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	KIJIMA, M. et al., Trapoxin, an antitumor cyclic tetra-peptide, is an irreversible inhibitor of mammalian histone deacetylase., J. Biol. Chem., Vol.268, No.30 (1993) p.22429-p.22435	1-9
A	BERNARDI, E. et al., Antitumoral cyclic peptide analogs of chlamydocin., Peptides (Pergamon) Vol.14, No.6 (1993) p.1091-p.1093	1-9

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.11.98

国際調査報告の発送日

17.11.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

藤森 知郎

4H

9357

電話番号 03-3581-1101 内線 3444

BEST AVAILABLE COPY